食品および環境中の免疫調節因子に関する研究

倉本雄一郎

1998

(1)

食品および環境中の免疫調節因子に関する研究

倉本雄一郎

1998

食品および環境中の免疫調節因子に関する研究

目次

第１章　緒論 1

第２章　WEHI-279細胞のクローニングおよび
細胞表面免疫グロブリン分布 5

第３章　食用色素の抗体産生調節機能 １７

第４章　香辛料の抗体産生調節機能 ３３

第５章　ローズベンガルの抗体産生調節機構の解析 ４６

第６章　ヒトリンパ球培養細胞株の抗体産生に及ぼす
ローズベンガルの影響 ６３

第７章　大気汚染物質の免疫調節機能の解明 ７６

第８章　総括 ９１

参考文献 １０１

第１章　緒論

日本人のライフスタイルは過去40年で大きく変化した。食生活については欧米化が進み、脂肪の摂取が大きく増えた。一方、日本人をとりまく環境は工業化の発達や自動車が増加し、われわれの生活は飛躍的に向上した。その一方で、こうしたライフスタイルの変化はさまざまな負の影響をもたらした。例えば、脂肪摂取の増加はガンや動脈硬化の発症を増加させ（Niebauer *et al.*, 1995; Loft *et al.*, 1996）、いくつかの食品添加物がアレルギー症状を引き起こすことが報告されている（Tarlo *et al.*, 1993; Weber, 1993; Wuhrich, 1993; Nish *et al.*, 1991）。また、自動車の増加は大気汚染を悪化させ、アレルギー患者の増加に繋がったことが指摘されている。ディーゼル機関の排出ガス中の微粒子（DEP）はアレルギー促進的に働くことが報告されている（Muranaka *et al.*, 1986; Takafuji *et al.*, 1987, 1989; Takenaka *et al.*, 1995）。日常生活においても、ラットをタバコの副流煙に慢性的にさらすと、胸腺依存的および非依存的な抗原に対する抗体産生細胞の応答が抑制され、B細胞の機能低下に繋がることや（Savage *et al.*, 1991）、タバコの煙に含まれるニコチンはヒト末梢血単核細胞の抗体産生を調節することが報告されている（Fischer *et al.*, 1994）。このように、日本人の生活習慣病やアレルギーといった疾患は過去数十年のライフスタイルの変化が主な原因とされており、現在多くの研究者によってその解決法が模索されているが、発症機構が複雑であるので治療法は未だ確立されていない。

アレルギー反応が引き起こされるとき、一部の食品添加物はその発症に重要な役割を演じることが知られているが、その発症機構についてはほとんど明らかにされていない。われわれの食生活に注目すると、多くの食品添加物や化学物質に囲まれていることに気がつく。われわれは食品添加物を着色、保存、着香など、われわれの利益になるように使用しているが、それらに対する多くの副作用も報告されている。例えば、亜硫酸塩は喘息を、タートラジンはじんましんをそれぞれ引き起こし（Tarlo *et al.*, 1993; Weber, 1993; Wuhrich, 1993）、アナトー色素はアナフィラキシー反応を引き起こすことが報告されている

（Nish *et al.*, 1991）。タール色素は安価で安定性が高いことから多く用いられてきたが、他の多くの合成色素と同様に発癌性、変異原性を有することが報告され、その使用量は減少しつつある。一方、古くから食用色素として用いられてきた天然色素の使用量が近年増加している。天然色素は合成色素に比べて安定性に劣るため着色効果を高めるために使用量を多くしなくてはならず、そのため生体に与える影響が注目されている。さらに天然色素は着色効果に加えて、様々な生理活性を有することが報告されている。例えば、*Curcuma longa*から抽出されるクルクミンが、免疫調節作用を有すること（Li *et al.*, 1993; Sui *et al.*, 1993; Yasuni *et al.*, 1993）、アフラトキシンにより誘導される肝障害を緩和すること（Soni *et al.*, 1992）、脂質代謝調節機能を有すること（Fujiyama-Fujiwara *et al.*, 1992; Ammon *et al.*, 1993; Srivastava *et al.*, 1995）、遺伝子発現調節機能を有することが報告されている（Huang *et al.*, 1991; Kakar *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994）。また、紅麹菌から抽出されるモナスカス色素はTPAの発癌プロモーション効果を抑制することが報告されている（Yasukawa *et al.*, 1994）。また、香辛料は食品に風味を付与するほかに腐敗や細菌の繁殖を防ぐ働きがあり（Adegoke *et al.*, 1994）、様々な保存食に利用されてきた。しかし、天然色素や香辛料の免疫調節機能についてはほとんど明らかにされていない。

ディーゼルエンジンの排出ガス成分は大きく２種類に分けられる。一つはガス状燃焼生成物であり、二酸化硫黄、窒素酸化物、二酸化炭素、アルデヒドおよび未燃焼炭化水素が含まれる。もう一つは粒子状燃焼生成物であり、硫酸塩、炭素質粒子、有機溶媒可溶成分（多環芳香族炭化水素、ニトロ多環芳香族類）および抽出不能物質である（加地、1993; Westerholm *et al.*, 1995; Zapponi *et al.*, 1997）。アレルギー発症の原因物質としては、ガス状燃焼生成物よりも粒子状燃焼生成物の方が注目されており、例えば炭素質粒子（DEP）はアジュバント作用を有し、IgE産生を増強することが報告されている（Diaz-Sanchez *et al.*, 1994; Takenaka *et al.*, 1995）。また、多環芳香族炭化水素（PAH）が免疫抑制作用を有すること（Holladay *et al.*, 1994）、2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（TCDD）がB細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させること（Karras *et*

al., 1996）などが報告されている。

食品および環境アレルゲンに対するアレルギーは主としてⅠ型アレルギー反応により引き起こされるが、この反応においてはアレルゲン特異的IgEの誘導が重要な役割を演じる（Metcalfe, 1991）。一方、アレルゲン特異的IgAはアレルゲンの腸管吸収を阻害することによりアレルギーの発症を抑制する。また、アレルゲン特異的IgGはIgEとの競合によりⅠ型アレルギーを抑制する。クラス特異的抗体産生調節は、IL-4、IL-5、IFN-α、IFN-γによって誘導されることが知られている（Elson *et al.*, 1994; Gauchat *et al.*, 1991; Ochel *et al.*, 1991; Pene *et al.*, 1988; Rousset *et al.*, 1991）。同様な抗体のクラス特異的な産生調節は胆汁酸やレクチンでも報告されている（Lim *et al.*, 1994a, 1994b; Yamada *et al.*, 1993）。胆汁酸は1 mM以上の濃度でラット腸間膜リンパ節（MLN）リンパ球のIgE産生を促進し、IgA、IgGおよびIgM産生を抑制した（Lim *et al.*, 1994b）。コンカナバリンA（Con A）はIgE産生を増強し、アメリカヤマゴボウレクチン（PWM）はそれを抑制し、それ以外のクラスには影響を及ぼさないことが報告された（Lim *et al.*, 1994b）。また、細胞表面レセプターに結合した抗原特異的IgEを抗原が架橋することにより肥満細胞はヒスタミンおよびロイコトリエン（LT）などのケミカルメディエーターを放出し、アレルギー症状を引き起こすことが知られている（Plaut *et al.*, 1993）。LTは肥満細胞の膜リン脂質から遊離されるアラキドン酸のリポキシゲナーゼ酸化によって生成される（Dahlen *et al.*, 1986）。ロイコトリエンのうちLTB_4は、好中球の走化性によって誘導される炎症反応を亢進したり（Ford-Hutchinson *et al.*, 1980）、可溶性CD23の発現およびその遊離を増強し、B細胞のIgE産生を促進することが知られている（Dugas *et al.*, 1990; Yamaoka *et al.*, 1989）。こういった背景に立ち、本研究においては食品および環境中の免疫調節因子の検索を行い、それらが免疫機構に及ぼす影響について検討した。

食品および環境中の抗体産生調節因子を*in vitro*で検索する手段として、比較的実験方法が容易で短時間に結果が得られ、かつ生体に近い細胞応答を再現できることからラットおよびマウスのリンパ球が繁用されているが、この系では

様々な細胞間相互作用を考慮する必要があることから抗体産生調節メカニズムの解明には適用しずらい面があった。そこで樹立細胞株であるWEHI-279細胞を選び、抗体産生細胞に対する直接的な影響および抗体産生調節因子の作用機構を検討した。

第２章　WEHI-279細胞のクローニングおよび細胞表面免疫グロブリン分布

第１節　緒論

食品および環境中の抗体産生調節因子を*in vitro*で検索する手段として、比較的容易かつ生体に近い細胞応答を再現できることからラットおよびマウスのリンパ球が繁用されているが、この系では様々な細胞間相互作用を考慮する必要があることから抗体産生調節メカニズムの解明には適用しずらい面があった。そこで本章においては、樹立細胞株を用いた系を確立するためにWEHI-279細胞を選んだ。WEHI-279細胞はB細胞の分化の初期段階に位置し、高密度の細胞膜表面IgM（軽鎖はκ鎖）を発現している一方、培養上清中には抗体が検出されないことが報告されている（Warner *et al.*, 1979; Gutman *et al.*, 1981）が、本実験において用いられた細胞のポピュレーションなど不明な点が多い。本章においてはWEHI-279細胞について、産生される抗体、細胞膜免疫グロブリンおよび抗体に関する遺伝子の発現について検討を行った。

第２節　実験方法

第１項　試薬

FITC標識ラット抗マウスIgE、FITC標識ヤギ抗マウスIgGおよびFITC標識ヤギ抗マウスIgMはSouthern Biotechnology Associates社（Birmingham, AL）より購入した。

酵素抗体法に用いる試薬として、洗浄液には、0.05%Tween 20（和光純薬工業、大阪）含有PBS（TPBS）を、ブロッキング液にはBlock Ace（大日本製薬、大阪）を用いた。固相抗体には抗IgG抗体はヤギ抗マウスIgG（Zymed社, Sanfrancisco, CA）を、抗IgE抗体はラット抗マウスIgE（EIU社, Brussels, Belgium）を、抗IgM抗体はウサギ抗マウスIgM $F(ab')_2$断片（Zymed社）を、

抗IgA抗体はウサギ抗マウスIgA（Zymed社）を用いた。酵素標識抗体にはペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウスIgG $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）、HRP標識ウサギ抗マウスIgM $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）およびHRP標識ウサギ抗マウスIgA（Zymed社）を用いた。またIgE定量においてはビオチン標識ラット抗マウスIgE（EIU社）、およびHRP標識ストレプトアビジン（Prozyme社, San Leandro, CA）を用いた。

目的遺伝子に対するプライマーは、九州大学医学部付属生体防御医学研究所から提供された。

第２項　細胞培養および細胞染色

細胞として、WEHI-279細胞（九州大学医学部付属生体防御医学研究所から提供された）を用いた。細胞は10%ウシ胎児血清（FBS; GIBCO BRL社, Grand Island, NY）を含むRPMI-1640培地を用いて、5%CO_2環境下において継代培養した。

WEHI-279細胞の増殖曲線を作製し、経時的に抗体産生量を測定するために、細胞数を$1x10^5$ cells/mlに調整し10%FBSを含むRPMI-1640培地で１、２、３、４、６、８日間培養した。細胞数は血球計測板を用いて計測し、培養上清中の抗体価は第４項に示した酵素抗体法を用いて定量した。

WEHI-279細胞の表面免疫グロブリンを解析するためには、まず細胞を10%FBS含有PBS溶液で洗い、細胞懸濁液にFITC標識された抗マウスIgE、IgGおよびIgMを加えて氷中に30分放置した。その後、10%FBS含有PBS溶液で細胞に結合していない標識抗体を洗い、最後にステンレスメッシュを通してフローサイトメーター（EPICS PROFILE II; Coulter社, Miami, FL）で解析した。

第３項　遺伝子増幅法

目的遺伝子の発現を確認するために、RT-PCR法を用いた。操作は次のように行った。はじめに、WEHI-279細胞から全RNAを抽出した。10^7個の細胞をPBSで洗浄後、ペレット状の細胞にTRIzol（GIBCO BRL社）を加え、取り扱

い説明書に従って全RNAを分離した。分離したRNAを75%エタノールで洗い、つづいて水に溶解させた。10 μgのRNAを逆転写酵素（United States Biochemical社, Cleveland, OH）を用いて分離したRNAに対して相補的なDNA（cDNA）を作製した。

つぎに、目的遺伝子に対するプライマー（九州大学医学部付属生体防御医学研究所から提供された）を用いて目的遺伝子を増幅した。反応液には、0.4 unitsのTaqポリメラーゼ（Fermentas社, Vilnius, Lithuania）、それぞれ2.5 mMのデオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む溶液、200 μMのプライマーおよび10 μMのcDNAを混合した溶液を用い、これに緩衝液および塩化マグネシウム溶液を加えた。最後に、Gene Amp PCR system 2400（Perkin Elmer社, Foster City, CA）を用い、Fig. 2-1に示したような方法で目的遺伝子を増幅した。

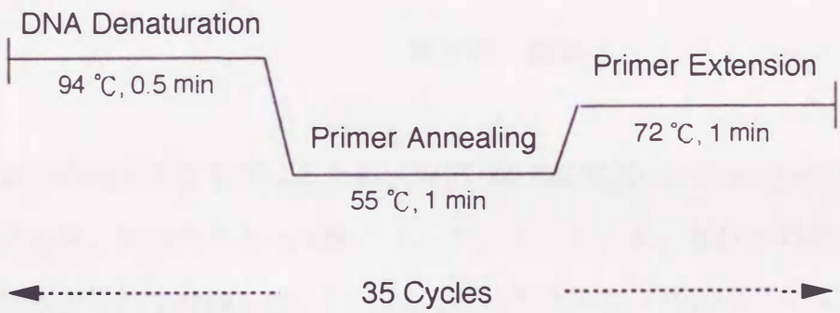


Fig. 2-1. Temperatures and Reaction Periods Used During Amplification Cycles.

PCR産物は、2%アガロースゲル（Sawady Technology社、東京）を用いて電気泳動し、臭化エチヂウム（和光純薬工業）でDNAを染色し、紫外線によって得られた画像をKodak Digital Science（Eastman Kodak社, Rochester, NY）で撮影した。

第4項　酵素抗体法

抗体価の測定は、Yamada *et al.*（1993）の方法に従って行った。IgGおよびIgMの定量には直接法を用い、IgEの定量にはアビジン-ビオチン法を用いた。まず、96穴イムノプレートに固相抗体を加えて37℃にて1時間保温し、TPBSで3回洗浄した。次に、ブロッキング液を加え、37℃にて1時間保温もしくは4℃にて一晩放置した後、洗浄した。これ以後の洗浄操作ではアビジン-ビオチン法で各4回、直接法で各3回行った。次に、一次抗体（サンプル上清）を加えて37℃で1時間保温し、洗浄した。IgE定量ではさらに二次抗体を加えて37℃にて1時間保温し、洗浄した。最後に、酵素標識抗体を加えて37℃で1時間保温して、洗浄液で洗浄後、基質溶液を加えて37℃で15分間反応後、反応停止液を加えて415nmで吸光度を測定した。

第3節　結果

細胞の増殖速度を調べるため、WEHI-279細胞を$1x10^5$ cells/mlの細胞濃度でまき込んだ。細胞のまき込み後、1、2、3、4、6、8日目の細胞濃度を血球計測板を用いて計測した。Fig. 2-2に示したように、WEHI-279細胞は、まき込み開始から3日以内では対数増殖期にあり、その後、増殖速度は低下してまき込みから6日目には増殖は停止した。

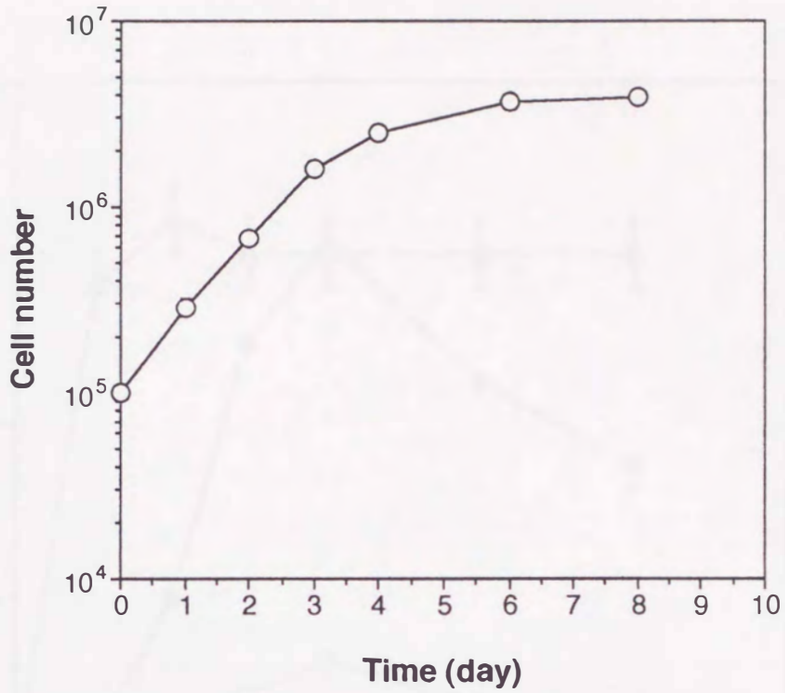


Fig. 2-2. Growth-Curve of WEHI-279 Cells. Values are means ± SE (n= 3).

つぎに、WEHI-279細胞の抗体産生能について検討した。WEHI-279細胞を $1x10^5$ cells/mlの細胞濃度でまき込み、1、2、3、4、6、8日目の培養上清中の抗体濃度を酵素抗体法を用いて測定した。IgGおよびIgMに関してはng/mlで表示し、IgEに関してはoptical density（OD値）で表示した。

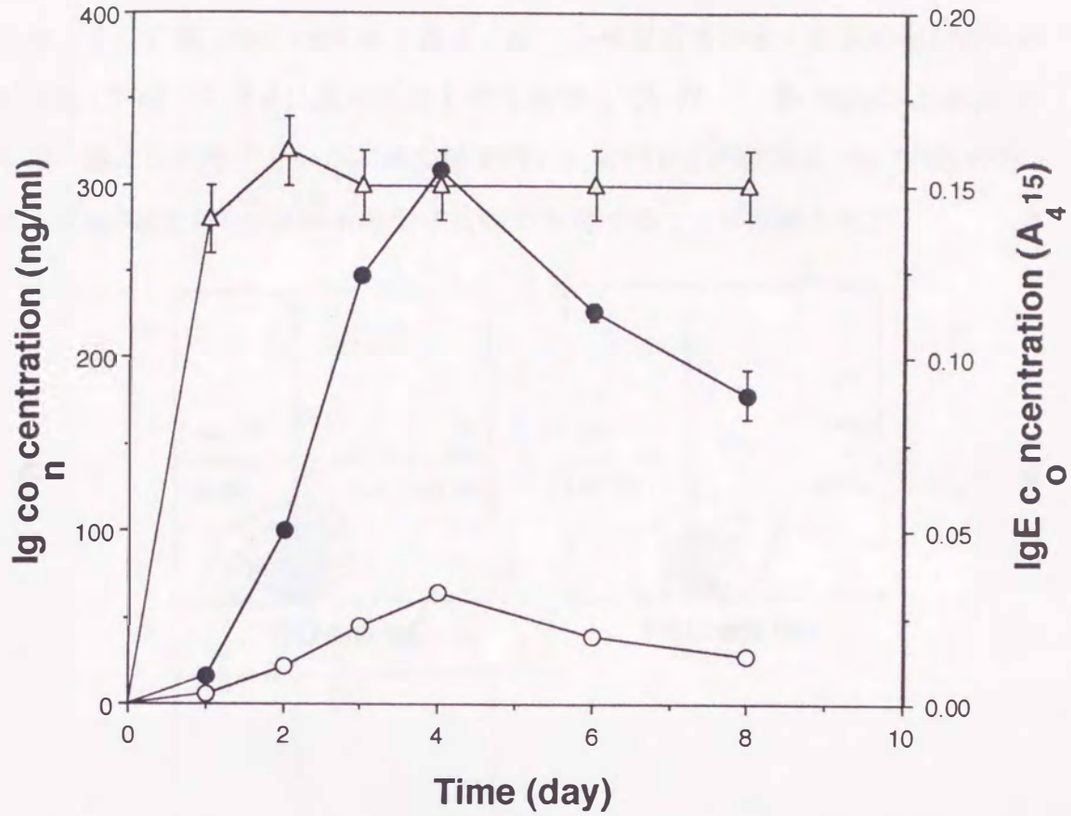


Fig. 2-3. Time-course of Immunoglobulin Accumulation in Culture Supernatant of WEHI-279 Cells. Cells were cultured for various days and Ig concentration in the culture supernatant was measured by ELISA. IgG (○) and IgM (●) concentrations were indicated as ng/ml and that of IgE (△) as OD (optical density).

その結果、Fig. 2-3に示したように、上清中のIgGおよびIgM濃度は培養開始から4日目に最高濃度に達し、その後抗体濃度は低下した。一方、IgE濃度は培養を開始して1日目から急速に上昇し、2日目に最高濃度に達した。その後、IgE濃度は一定の濃度を維持した。これらの結果から、WEHI-279に及ぼす影響を検討する実験においては、まき込み開始から4日以内に細胞もしくは培養上清を回収することにした。これまでの報告では、WEHI-279細胞は高密度に細胞表面IgMを発現しており、抗体は産生していないという報告がある（Gutman et al., 1981）。そこで、フローサイトメーターを用いてWEHI-279細胞の細胞表面免疫グロブリン分布について解析した。対数増殖期を過ぎた後のWEHI-279

細胞を1x10^5 cells/mlに調整し、第2章第2節第2項に示したように細胞を染色した。その結果、Fig. 2-4に示したように、以前報告されたとおり細胞表面におけるIgMが他のクラスに比べて最も多く発現していた。一方、IgGおよびIgEの発現も認められたことから、本実験で用いたWEHI-279細胞は、IgM抗体のみならずIgGおよびIgE抗体も産生する能力を有することが示唆された。

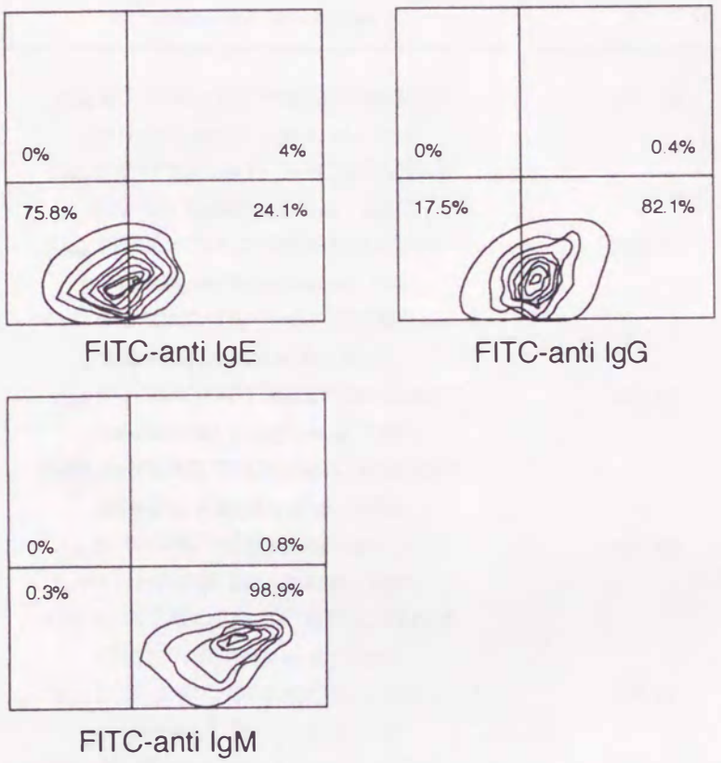


Fig. 2-4. Expression of Surface Immunoglobulin on WEHI-279 Cells.
Surface Igs were detected by flow-cytometer.

さらに、WEHI-279細胞の抗体mRNA発現について解析した。対数増殖期を過ぎた後のWEHI-279細胞を1x10^7 cellsに調整し、第2章第2節第3項に従ってmRNAを分離し、プロダクティブμmRNA（Pμ）、Pγ1、Pγ2b、Pγ3およびPε、およびIgMからIgEへのクラススイッチの際に発現が認められるε鎖の胚型転写物（Gε）とIgMからIgG1へのクラススイッチの際に発現が認められるGγ1の発現を解析するためにRT-PCR法を用いて目的遺伝子を増幅した。ハウスキーピング遺伝子にはβ-actinを用いてcDNAの作製が成功したかの指標とした。抗体遺伝子の増幅に用いたプライマーはTable. 2-1に示した。その結果、Fig. 2-5に

示したように用いたWEHI-279細胞は継代中、常にPε、Pμを発現していることが明らかとなった。

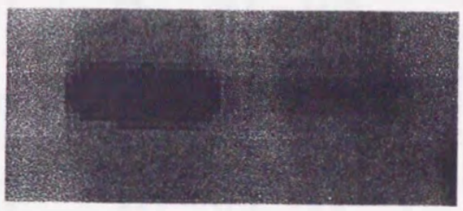
Table 2-1. Sequences of Primers Used in the Experiment.

Amplified RNA	Primer Sequence (Position and Reference)	Size of Amplified Product
Pμ	J_{H4}: 5'-TGGACTACTGGGGTCAAGG-3' (no numbered, Gough *et al.*, 1981) Cμ: 5'-CATTGGGATTCATCTCTGCG-3' (439-458, Kawakami *et al.*, 1980)	382 bp
Pγ1	J_{H4}: 5'-TGGACTACTGGGGTCAAGG-3' (no numbered, Gough *et al.*, 1981) Cγ1: 5'-GACAGATGATACTTCTGGGA-3' (884-903, Honjo *et al.*, 1979)	392 bp
Pγ2b	J_{H4}: 5'-TGGACTACTGGGGTCAAGG-3' (no numbered, Gough *et al.*, 1981) Cγ2b: 5'-TCCACCCTCGAGGTTAGGAG-3' (954-973, Kataoka *et al.*, 1979)	419 bp
Pγ3	J_{H4}: 5'-TGGACTACTGGGGTCAAGG-3' (no numbered, Gough *et al.*, 1981) Cγ3: 5'-TCCACCCAAGATGTTACCAG-3' (2811-2830, Wels et al., 1984)	401 bp
Pε	J_{H4}: 5'-TGGACTACTGGGGTCAAGG-3' (no numbered, Gough *et al.*, 1981) Cε2: 5'-AGCGATGAATGGAGTAGC-3' (991-1008, Ishida *et al.*, 1982)	365 bp
Gε	Iε: 5'-ACTAGAGATTCACAACG-3' (771-778, Gerondakis, 1990) Cε2: 5'-AGCGATGAATGGAGTAGC-3' (991-1008, Ishida *et al.*, 1982)	423 bp
Gγ1	Iγ1: 5'-CGAGAAGCCTGAGGAATGTG-3' (351-370, Honjo *et al.*, 1979) Cγ1: 5'-GACAGATGATACTTCTGGGA-3' (991-1008, Ishida *et al.*, 1982)	418 bp
β-Actin	sense: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' antisense: 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	348 bp

1 2 3 4 5

Fig. 2-5. Expression of Productive mRNAs in WEHI-279 Cells. Each separated mRNA from WEHI-279 cells was amplified by RT-PCR. Each lane was indicated as: Lane 1, μ mRNA (Pμ); Lane 2, Pγ3; Lane 3, Pγ1; Lane 4, Pγ2b; Lane 5, Pε.

さらに、Fig. 2-6に示したように、GεおよびGγ1の発現も認められたことから、本実験で用いたWEHI-279細胞はIgMからIgG1もしくはIgEへのクラススイッチが誘導できることが示唆された。



1 2

Fig. 2-6. Expression of Germ-line mRNAs in WEHI-279 Cells. Each separated mRNA from WEHI-279 cells was amplified by RT-PCR. Each lane was indicated as: Lane 1, γ1 mRNA (Gγ1); Lane 2, Gε.

今までの結果から、本実験で用いたWEHI-279細胞はIgM、IgGおよびIgE産生細胞が混在していることが示唆されたため、つづいてこの細胞をクローニングして各クラスの抗体産生細胞を得ることについて検討した。クローニングには限界希釈法を用いた。簡単に説明すると、96穴のプレートにおいて、1穴あ

たり0.8個の細胞が入るように細胞数を調整した。このような濃度の細胞を96穴のプレートに10枚まき込んで、1穴に1個のみ入っている部分に印を付けて、20%FBSを含むRPMI-1640培地中で約2週間培養した。その後同様な操作をもう一度繰り返し、単クローン細胞を得た。このようにして得られたWEHI-279細胞の培養上清中の抗体価を酵素抗体法によって測定した。その結果、Table 2-2に示したように、単クローン細胞からIgMおよびIgG抗体の両方が検出された。この結果から、本実験で用いたWEHI-279細胞にはIgM、IgG両抗体を産生するDouble producerが存在することが示唆された。しかし、今回用いた実験系では、酵素抗体法におけるIgM抗体とIgG抗体の交差反応を考慮する必要があり、Double producerの確認のために更なる検討が必要である。

Table 2-2. Immunoglobulin Concentration in the Culture Supernatant of WEHI-279 Clones.

Clone No.	IgM (μg/ml)	IgG (ng/ml)	Clone No.	IgM (μg/ml)	IgG (ng/ml)	Clone No.	IgM (μg/ml)	IgG (ng/ml)
1	10.2	13.7	24	9.1	11.3	47	9.9	11.4
2	9.8	14.0	25	9.1	12.1	48	8.9	5.9
3	9.8	13.1	26	9.6	10.2	49	10.1	15.8
4	7.9	7.0	27	9.2	9.7	50	10.1	9.1
5	9.7	13.3	28	8.9	10.5	51	9.6	8.0
6	9.6	11.0	29	9.1	11.3	52	6.9	4.9
7	9.8	14.1	30	9.2	8.8			
8	10.0	15.0	31	9.4	11.7			
9	9.6	15.5	32	9.7	13.3			
10	9.6	13.6	33	9.5	20.1			
11	9.8	14.5	34	9.6	15.6			
12	9.1	11.3	35	9.8	10.9			
13	9.9	14.6	36	9.6	12.9			
14	9.0	15.7	37	9.5	11.0			
15	10.2	14.2	38	9.6	12.9			
16	9.4	12.0	39	9.5	14.7			
17	9.2	10.0	40	9.5	8.1			
18	9.6	18.0	41	9.7	11.7			
19	7.9	8.0	42	10.0	12.6			
20	9.7	14.0	43	9.8	14.9			
21	9.3	12.5	44	7.6	7.0			
22	9.0	9.5	45	9.6	11.1			
23	9.4	11.9	46	9.5	9.1			

第4節　考察

様々な食品および環境中の抗体調節因子の検索を試みるために、これまでマウスおよびラットの脾臓あるいは腸間膜リンパ節（MLN）リンパ球が用いられた。このとき問題になるのはT細胞由来のサイトカインの関与を考慮しなければならないということである（Armitage *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1995; Ling *et al.*, 1995）。そこで、直接B細胞に作用する抗体産生調節因子についての検索を行うために、マウスBリンパ腫であるWEHI-279細胞を用いることにした。本実験においては九州大学医学部付属生体防御医学研究所より提供されたWEHI-279細胞を用いたが、本来この細胞はWalter and Eliza Hall Institute（WEHI, Melbourne, Australia）において樹立された細胞株である。樹立当初のWEHI-279細胞はB細胞の分化の初期段階に位置し、高密度の細胞膜表面IgM（軽鎖はκ鎖）を発現しているが、培養上清中には抗体は検出されないことが報告されている（Warner *et al.*, 1979; Gutman *et al.*, 1981）。しかし、この細胞についての情報は非常に少ないため産生される抗体、細胞膜免疫グロブリンおよび抗体に関する遺伝子発現について検討した。本実験においてまず、IgGおよびIgE抗体が培養上清中において見出された（Fig. 2-3）。この結果については、B細胞より産生したサイトカインはautocrineまたはparacrine的な作用によってB細胞自身を刺激する（Pistoia, 1997）など、サイトカインの作用もしくは継代途中の突然変異によって抗体産生細胞に分化したことが考えられる。つぎに、細胞膜免疫グロブリンについて検討したところ、本実験におけるほとんどのWEHI-279細胞はIgMを細胞表面に発現していたが、一部にはIgGやIgEを発現していることがフローサイトメーターによる分析で示唆された。異なるクラスの抗体を細胞表面に同時に発現するとアポトーシスによって排除されるが（Kindler *et al.*, 1997）、本細胞にこのことが当てはまるかどうかはさらに検討し、IgGおよびIgE発現細胞をクローニングする必要がある。

最後に抗体に関する遺伝子発現については次のようなことが見出された。B細胞がIgMからIgGもしくはIgEへクラススイッチを引き起こすとき、胚型転写

物（GγおよびGε）の発現が認められることが知られているが（Ichiki *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1994）、WEHI-279細胞はGγ、Gε双方の発現が認められたことから、この細胞はIgMからIgGおよびIgEへクラススイッチを起こす能力を備えていることが示された。食品中には様々な抗体産生調節因子が見出されているが（Ahmed *et al.*, 1997; Kuramoto *et al.*, 1996; Verdaguer *et al.*, 1993）、その調節メカニズムはまだ不明な点が多い。WEHI-279細胞を用いた食品成分および環境中の抗体産生調節因子の検索は、このメカニズムの解明に対して非常に有用であると思われる。

第３章　食用色素の抗体産生調節機能

第１節　緒論

アレルギー反応が引き起こされるとき、一部の食品添加物がその発症に重要な役割を演じることが知られているが、その作用機構についてはほとんど明らかにされていない。日常の食生活に注目すると、多くの食品添加物や化学物質に囲まれていることに気がつく。食品添加物は着色、保存、着香など、われわれの利益になるように使用されているが、それらに対する多くの副作用も報告されている。例えば、亜硫酸塩は喘息を、タートラジンはじんましんをそれぞれ引き起こし（Tarlo *et al.*, 1993; Weber, 1993; Wuhrich, 1993）、アナトー色素はアナフィラキシー反応を引き起こすことが報告されている（Nish *et al.*, 1991）。

タール色素は安価で安定性が高いことから多く用いられてきたが、他の多くの合成色素と同様に発癌性、変異原性を有することが報告され、その使用量は減少しつつある。一方、古くから食用色素として用いられてきた天然色素の使用量が近年増加している。天然色素は合成色素に比べて安定性に劣るため着色効果を高めるために使用量を多くしなくてはならず、そのため生体に与える影響が注目されている。さらに天然色素は着色効果に加えて、様々な生理活性を有することが報告されている。例えば、*Curcuma longa*から抽出されるクルクミンが、免疫調節作用を有すること（Li *et al.*, 1993; Sui *et al.*, 1993; Yasuni *et al.*, 1993）、アフラトキシンにより誘導される肝障害を緩和すること（Soni *et al.*, 1992）、脂質代謝調節機能を有すること（Fujiyama-Fujiwara *et al.*, 1992; Ammon *et al.*, 1993; Srivastava *et al.*, 1995）、遺伝子発現調節機能を有することが報告されている（Huang *et al.*, 1991; Kakar *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1994）。また、紅麹菌から抽出されるモナスカス色素はTPAの発癌プロモーション効果を抑制することが報告されている（Yasukawa *et al.*, 1994）。しかし、天然色素の免疫調節機能についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では食品

添加物の免疫調節機能について検討を行った。

食品および環境アレルゲンに対するアレルギーは主としてⅠ型アレルギー反応により引き起こされるが、この反応においてはアレルゲン特異的IgEの誘導が重要な役割を演じる（Metcalfe, 1991）。一方、アレルゲン特異的IgAはアレルゲンの腸管吸収を阻害することによりアレルギーの発症を抑制する。また、アレルゲン特異的IgGはIgEとの競合によりⅠ型アレルギーを抑制する。そこで、本研究ではラット脾臓および腸間膜リンパ節リンパ球の各種の抗体産生に及ぼす天然、および合成食用色素の影響について検討した。

第２節　実験方法

第１項　器具および試薬

用いた天然食用色素のうち、6種の水溶性色素（ベタニン、カカオ色素、カーサマスイエロー、コチニール色素、コーン色素およびモナスカス色素）および4種の脂溶性色素（ビキシン、クルクミン、ガーディニアイエローおよびラック色素）は全て（財）日本食品分析センター（東京）より提供された。合成食用色素のうち、アマランス、ファストグリーンFCF、インディゴカルミン、タートラジン、水溶性アナトーは和光純薬工業（大阪）から、ブリリアントブルーFCF、ニューコクシン、銅クロロフィリンナトリウム、サンセットイエローFCFはキシダ化学（大阪）から購入した。水溶性色素はリン酸緩衝液（PBS、pH 7.4）に溶解して培養液の1/10量を添加し、脂溶性色素はジメチルスルフォオキシド（DMSO; ナカライテスク、京都）に溶解して培養液の1/1000量を添加した。

酵素抗体法に用いる試薬として、洗浄液には0.05%Tween 20（和光純薬工業）含有PBS（TPBS）を、ブロッキング液にはBlock Ace（大日本製薬、大阪）を用いた。固相抗体には抗IgG抗体はヤギ抗ラットIgGアフィニティー精製 F$(ab')_2$断片（Cappel社, West Chester, PA）を、抗IgE抗体はヤギ抗ラットIgE Fc領域アフィニティー精製7S画分（Nordic Immunology社, Tilburg, The

Netherlands）を、抗IgM抗体はヤギ抗ラットIgMアフィニティー精製 $F(ab')_2$ 断片（Zymed社, San Francisco, CA）を用いた。酵素標識抗体はペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ラットIgGアフィニティー精製 $F(ab')_2$ 断片（Cappel社）およびHRP標識ヤギ抗ラットIgMアフィニティー精製 $F(ab')_2$ 断片（Cappel社）を用いた。またIgE定量においてはビオチン標識マウス抗ラットIgE（Zymed社）、およびHRP標識アビジン（DAKOPATTS社, Copenhagen, Denmark）を用いた。

第２項　細胞調製および培養

実験動物には、9週齢雄Brown Norwayラット（セアック吉富、吉富）を用い、餌はMF（オリエンタル酵母、東京）を用いた。ラットは購入後直ちに実験に供するか、数日予備飼育してから実験に用いた。予備飼育の際は、ラット用ケージにおがくず床（ホワイトフレーク：オリエンタル酵母）を敷いて飼育した。

リンパ球は、Lim *et al.*（1994a）の方法に従って調製した。まず、ラットをエーテル麻酔下で屠殺し、脾臓および腸間膜リンパ節（MLN）を摘出した。次に、RPMI-1640（日水製薬、東京）培地中で脾臓およびMLNをすりつぶしてリンパ球を分離させ、Lympholyte-Rat（Cedarlane社, Hornby, Canada）を用いて密度勾配分離法によりリンパ球画分を得た。

ラットより分離した各リンパ球の培養では10%ウシ胎児血清（Intergen社, Purchase, NY）含有RPMI-1640培地を用いて 2×10^6 cells/mlに調整し、IgE定量においては6時間、IgGおよびIgM定量においては72時間、10%CO_2インキュベータ中で培養後、上清を回収し、抗体濃度の測定を行った。

第３項　酵素抗体法

抗体価の測定は、Yamada *et al.*（1993）の方法に従って行った。IgGおよびIgMの定量には直接法を用い、IgEの定量にはアビジン-ビオチン法を用いた。まず、96穴イムノプレートに固相抗体を加えて37℃にて1時間保温し、TPBSで３回洗浄した。次に、ブロッキング液を加え、37℃にて１時間保温もしくは4

℃にて一晩放置した後、洗浄した。これ以後の洗浄操作ではアビジン-ビオチン法で各4回、直接法で各3回行った。次に、一次抗体（サンプル上清）を加えて37℃で1時間保温し、洗浄した。IgE定量ではさらに二次抗体を加えて37℃にて1時間保温し、洗浄した。最後に、酵素標識抗体を加えて37℃で1時間保温して、洗浄液で洗浄後、基質溶液を加えて37℃で15分間反応後、反応停止液を加えて415nmで吸光度を測定した。

第4項　統計処理

得られた結果は、Student's *t*-testまたはDuncanの統計計算法（Duncan, 1955）に従って有意差検定を行った。

第3節　結果

第1項　ラット脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす水溶性天然色素の影響

Table 3-1にラット脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす水溶性天然食用色素の影響について検討した結果を示した。モナスカス色素は終濃度1 mMでIgE濃度を上昇させたが、1 mM以下の濃度ではIgE濃度を低下させた。それ以外の色素ではIgE濃度を低下させる傾向が認められた。ベタニン、カーサマスイエロー、モナスカス色素は終濃度1 mMにおいてIgGおよびIgM濃度を強く低下させたが、コチニール色素の低下効果は弱いものであった。しかし、これらの色素のIgGおよびIgM濃度低下効果は10 μMおよび100 μMでは認められなかった。

Table 3-1. Dose-dependent Effect of Water-soluble Colorings on Immunoglobulin Production by Rat Spleen Lymphocytes.

Coloring	Concentration (μM)	Relative Ig content IgE	IgG	IgM
Control	●	1.00±0.07	1.00±0.03	1.00±0.03
Cacao pigment	10	0.74±0.07**	0.96±0.02	0.95±0.02
	100	0.88±0.08	1.03±0.02	1.11±0.01**
	1000	0.71±0.04**	1.02±0.01	1.18±0.03**
Cochineal pigment	10	0.76±0.07*	0.99±0.04	1.06±0.02
	100	0.78±0.11	1.08±0.03	1.28±0.02***
	1000	0.80±0.04**	0.71±0.04**	0.82±0.02**
Corn pigment	10	0.72±0.04**	0.95±0.03	1.02±0.01
	100	0.78±0.07*	1.03±0.04	1.07±0.01*
	1000	1.09±0.16	0.85±0.01**	1.01±0.02
Betanin	10	0.43±0.02***	0.94±0.02	1.12±0.04*
	100	0.54±0.05***	0.91±0.04	1.18±0.04**
	1000	0.76±0.09*	0.27±0.02***	0.36±0.01***
Carthamus yellow	10	0.69±0.09*	0.92±0.01	1.13±0.03*
	100	0.89±0.05	1.02±0.04	1.12±0.07
	1000	0.83±0.04*	0.00±0.00***	0.43±0.00***
Monascus pigment	10	0.58±0.03***	0.97±0.02	1.07±0.02
	100	0.81±0.06*	0.92±0.03	0.94±0.03
	1000	1.26±0.04**	0.09±0.06***	0.15±0.06***

Ig concentrations of the control culture were 6.81±0.51 ng/ml for IgE, 30.5±0.92 ng/ml for IgG and 78.2±2.3 ng/ml for IgM. Values are the mean±SD of 4 cultures. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$ compared with the control.

第２項　ラット脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす非水溶性天然色素の影響

次に、ラット脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす非水溶性天然色素の影響について検討した。 Table 3-2に示したように、ガーディニアイエロー、ラック色素およびビキシンは、今回用いた終濃度（1-100 μM）ではIgE濃度を低下させたが、クルクミンの効果は弱いものであった。クルクミンは100 μMではIgGおよびIgM濃度を低下させたが、1および10 μMでIgM濃度を上昇させた。同様な

IgM濃度上昇効果はクルクミン以外の色素でも認められた。中でも、ラック色素は最も高い促進活性を示し、100 μMでIgG濃度を有意に上昇させた。

Table 3-2. Dose-dependent Effect of Water-insoluble Colorings on Immunoglobulin Production by Rat Spleen Lymphocytes.

Coloring	Concentration (μM)	Relative Ig content		
		IgE	IgG	IgM
Control	0	1.00±0.04	1.00±0.02	1.00±0.01
Gardenia yellow	1	0.54±0.11**	1.04±0.01	1.24±0.04***
	10	0.67±0.09**	1.04±0.04	1.16±0.04**
	100	0.83±0.06*	0.90±0.03*	1.11±0.05*
Laccaic acid	1	0.46±0.09***	1.06±0.03	1.25±0.03***
	10	0.45±0.07***	1.16±0.07*	1.33±0.04***
	100	0.61±0.09**	1.40±0.12**	1.62±0.11***
Bixin	1	0.54±0.04***	1.04±0.02	1.27±0.02***
	10	0.56±0.06***	1.03±0.03	1.25±0.04***
	100	0.80±0.04**	0.96±0.03	1.13±0.05*
Curcumin	1	0.92±0.11	1.05±0.02	1.31±0.03***
	10	0.86±0.11	1.14±0.10	1.29±0.06**
	100	0.86±0.10	0.14±0.03***	0.24±0.02***

The Ig concentrations of the control culture were 6.45±0.25 ng/ml for IgE, 24.1±0.52 ng/ml for IgG and 64.7±0.95 ng/ml for IgM. Values are the mean±SD of 4 cultures. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$ and ***$p < 0.001$ compared with the control.

第３項　ラット脾臓および腸間膜リンパ球の抗体産生に及ぼすアゾ色素の影響

ラット脾臓およびMLNリンパ球の抗体産生に及ぼす食用色素の影響について、合成色素であるアゾ色素を用いて検討した。アゾ色素は構造中にアゾ結合（-N=N-）を有するのでこのような名が付いている。ここで用いた食用色素は、アマランス、ニューコクシン、タートラジンおよびサンセットイエローFCFである。これらの色素と共に脾臓リンパ球を72時間培養し、上清を回収した後それに含まれる抗体価を酵素抗体法で定量した。抗体価は、PBS存在下の抗体価（コントロール）に対する相対的な濃度として表した。まず、ラット脾臓リン

パ球の抗体産生に及ぼすアゾ色素の影響について検討した。Fig. 3-1に示したように、アゾ色素は10^{-1}から10^{3} μMの間の濃度ではIgGおよびIgMレベルに影響を及ぼさなかった。ニューコクシン、タートラジンおよびサンセットイエローFCFは10^{0}から10^{3} μMの間の濃度ではIgEレベルに影響を及ぼさなかったが、アマランスは10^{1} μMでIgEレベルをコントロールの半分に低下させた。

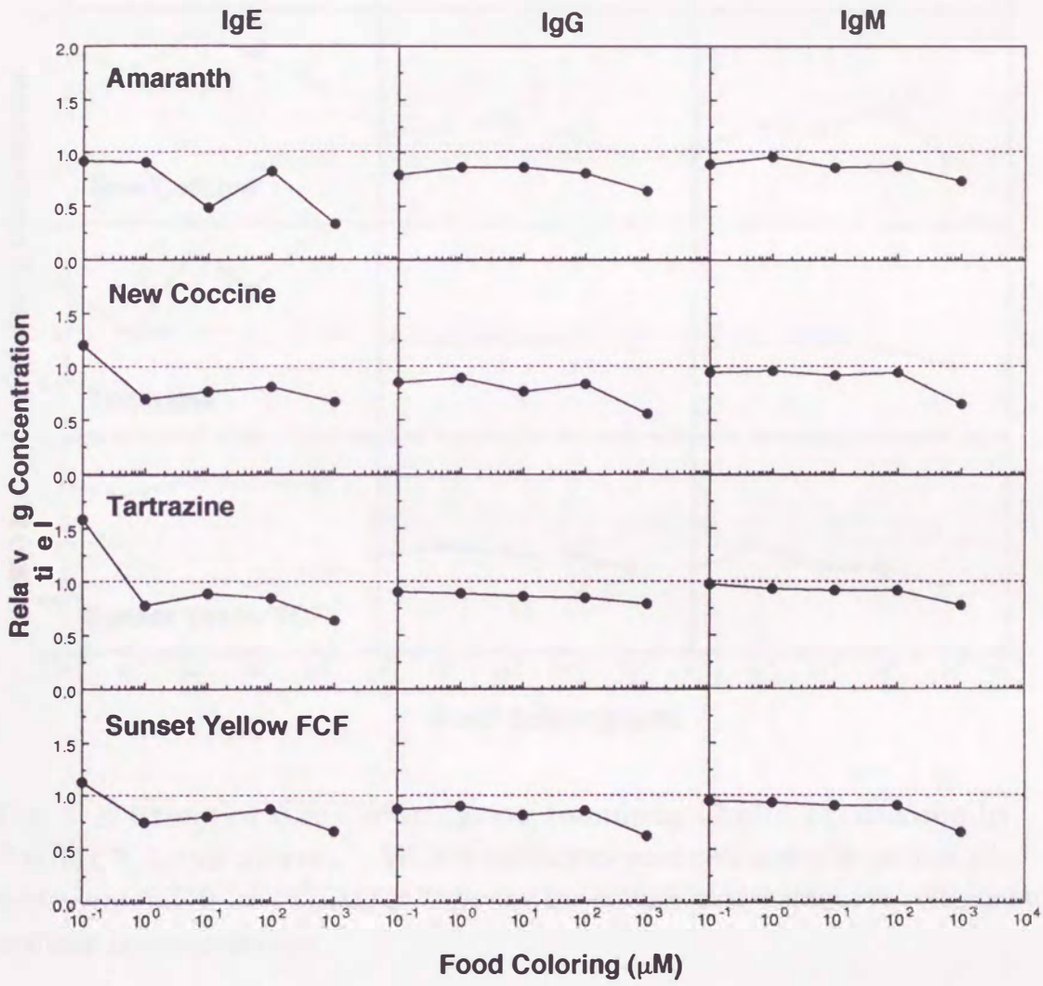


Fig. 3-1. Effect of Azo Colorings on Immunoglobulin Production by Rat Spleen Lymphocytes. Spleen lymphocytes were cultured with various azo dyes at around 10^{-1} to 10^{3} μM for 72 hr and the culture supernatant was collected to evaluate Ig concentration.

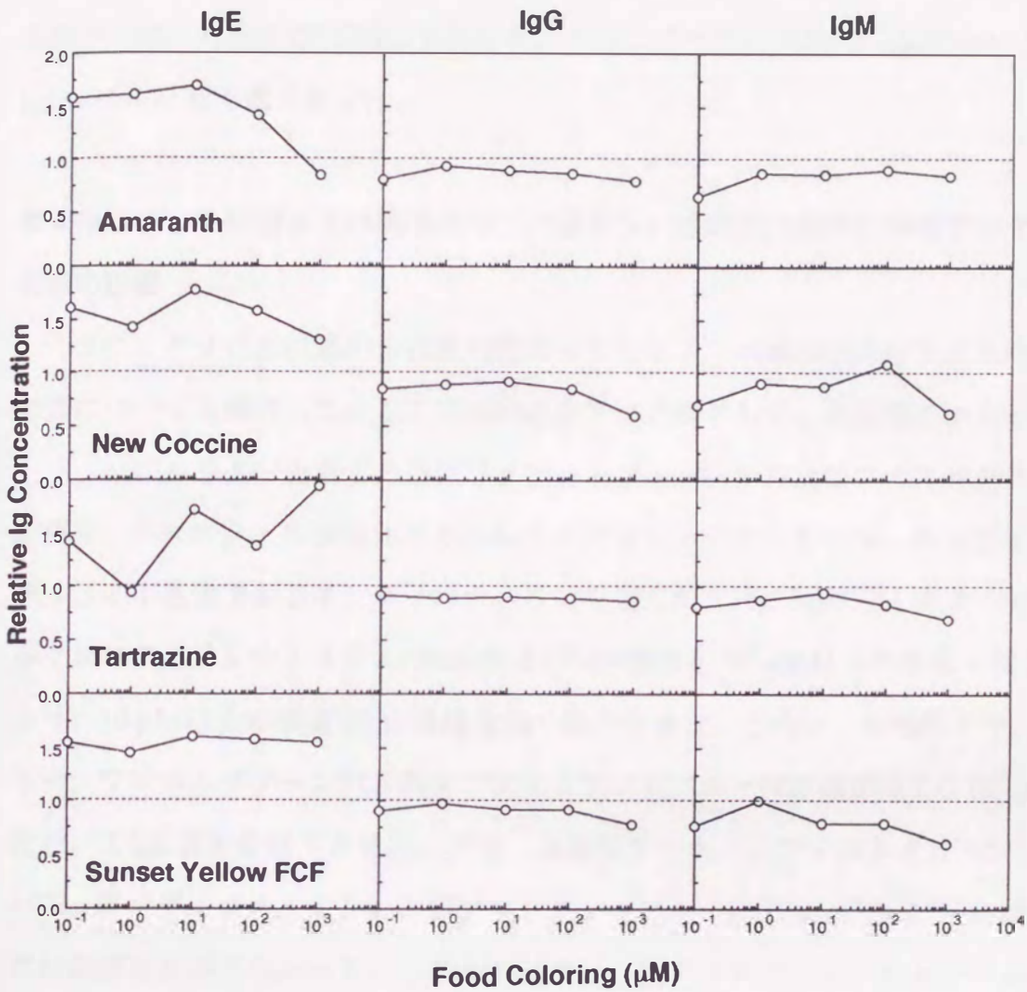


Fig. 3-2. Effect of Azo Colorings on Immunoglobulin Production by Rat MLN Lymphocytes. MLN lymphocytes were cultured with various azo dyes at around 10^{-1} to 10^{3} μM for 72 hr and the culture supernatant was collected to evaluate Ig concentration.

つぎに、ラットMLNリンパ球の抗体産生に及ぼすアゾ色素の影響について検討した。MLNリンパ球は腸管免疫系に属するリンパ球で腸管局所における免疫反応を担当し、食物アレルギーの発症に大きく関わっている。そこで、全身免疫系に関わる脾臓リンパ球の抗体産生と比較するために、MLNリンパ球の抗体産生に及ぼす食用色素の影響について検討した。Fig. 3-2に示したように、アゾ

色素は用いた濃度領域ではIgGおよびIgM濃度に影響を及ぼさず、この結果は脾臓リンパ球の場合と同様であった。しかし、IgEレベルは全てのアゾ色素の存在下では、対照区の1.5倍に上昇した。一方、アマランスは10^3 μMにおいてIgEレベルを若干低下させた。

第４項　ラット脾臓および腸間膜リンパ節リンパ球の抗体産生に及ぼす非アゾ色素の影響

つぎに、アゾ色素以外の合成食用色素がラットリンパ球の抗体産生に及ぼす影響についても検討した。ここで用いた非アゾ色素として、水溶性アナトー、トリフェニルメタン色素であるブリリアントブルーFCFおよびファストグリーンFCF、クロロフィル誘導体である銅クロロフィリンナトリウム、およびインディゴイド色素であるインディゴカルミンを選んだ。Fig. 3-3に示したように、銅クロロフィリンナトリウムはIgGおよびIgM濃度を10^2 μM以上の濃度で低下させ、10 μM以上の濃度でIgE濃度を強く低下させた。さらに、水溶性アナトー、ファストグリーンFCFおよびブリリアントブルーFCFは10および10^2 μMにおいてIgE濃度を低下させた。一方、水溶性アナトー、ファストグリーンFCF、インディゴカルミンおよびブリリアントブルーFCFはIgGおよびIgM濃度には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、銅クロロフィリンナトリウムは10 μM以上の濃度において免疫グロブリン産生を抑制する効果を有すること、水溶性アナトー、ファストグリーンFCFおよびブリリアントブルーFCFは10および10^2 μMにおいて選択的にIgE産生を抑制することを示唆している。MLNリンパ球においては、銅クロロフィリンナトリウムは1 μM以上でIgE濃度を強く低下させ、10 μMでIgGおよびIgM濃度を低下させた（Fig. 3-4）。MLNリンパ球において、この色素の抗体産生抑制効果が認められる濃度は、脾臓リンパ球のときの濃度に比べて10倍低かったことから、MLNリンパ球は脾臓リンパ球よりも銅クロロフィリンナトリウムに対して感受性が高いことが示唆された。一方、銅クロロフィリンナトリウム以外の色素はIgGおよびIgM濃度に影響を及ぼさないことが示された。しかし、水溶性アナトーおよびファストグリーン

FCFは10および10^2 μMにおいてIgE濃度を低下させた。

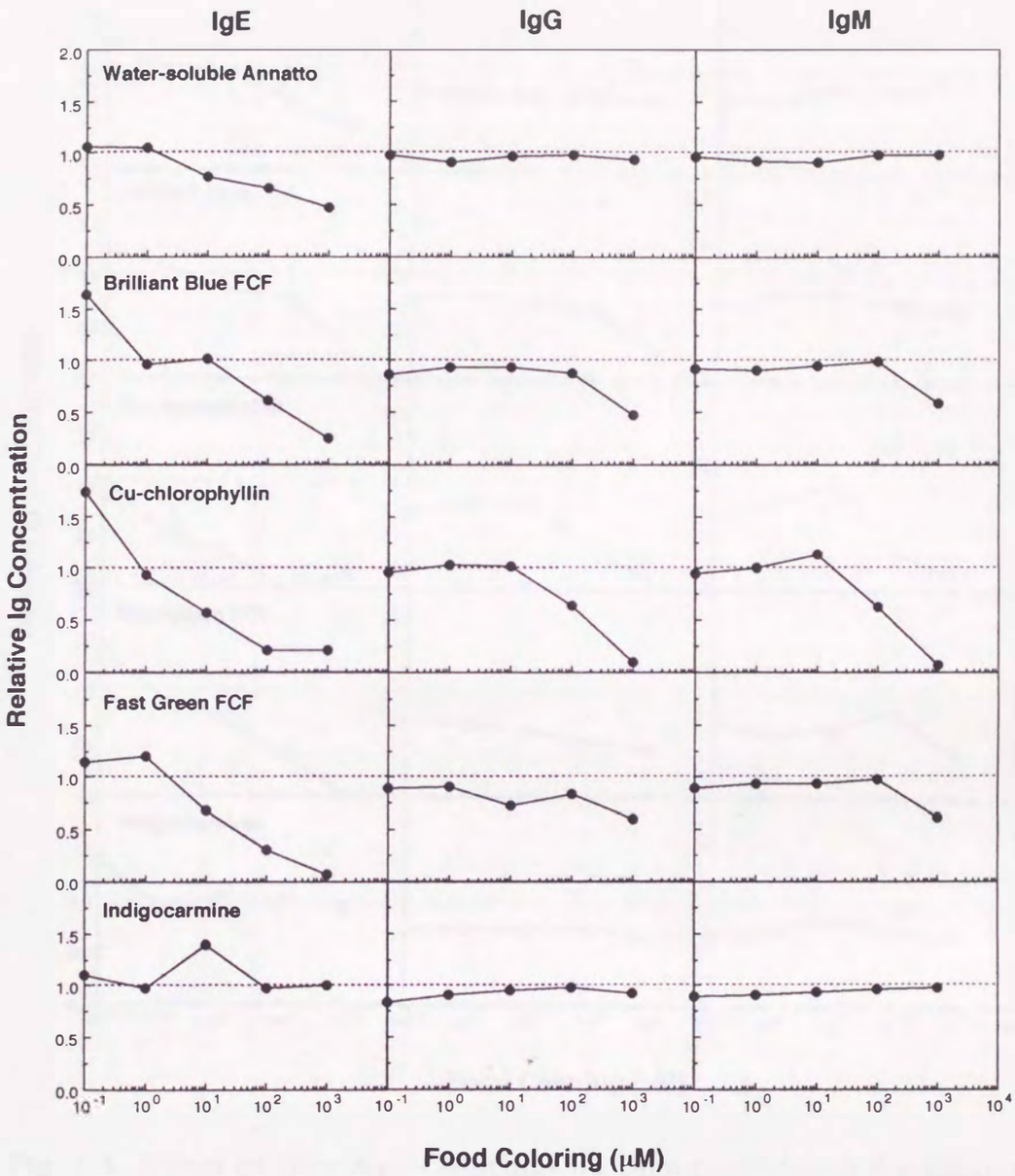


Fig. 3-3. Effect of Non-Azo Colorings on Immunoglobulin Production by Rat Spleen Lymphocytes. Spleen lymphocytes were cultured with various colorings such as triphenylmethane dyes (brilliant blue FCF and fast green FCF), indigoid dye (indigocarmine), water-soluble annatto and sodium Cu-chlorophyllin at around 10^{-1} to 10^3 μM for 72 hr and the culture supernatant was collected to evaluate Ig concentration.

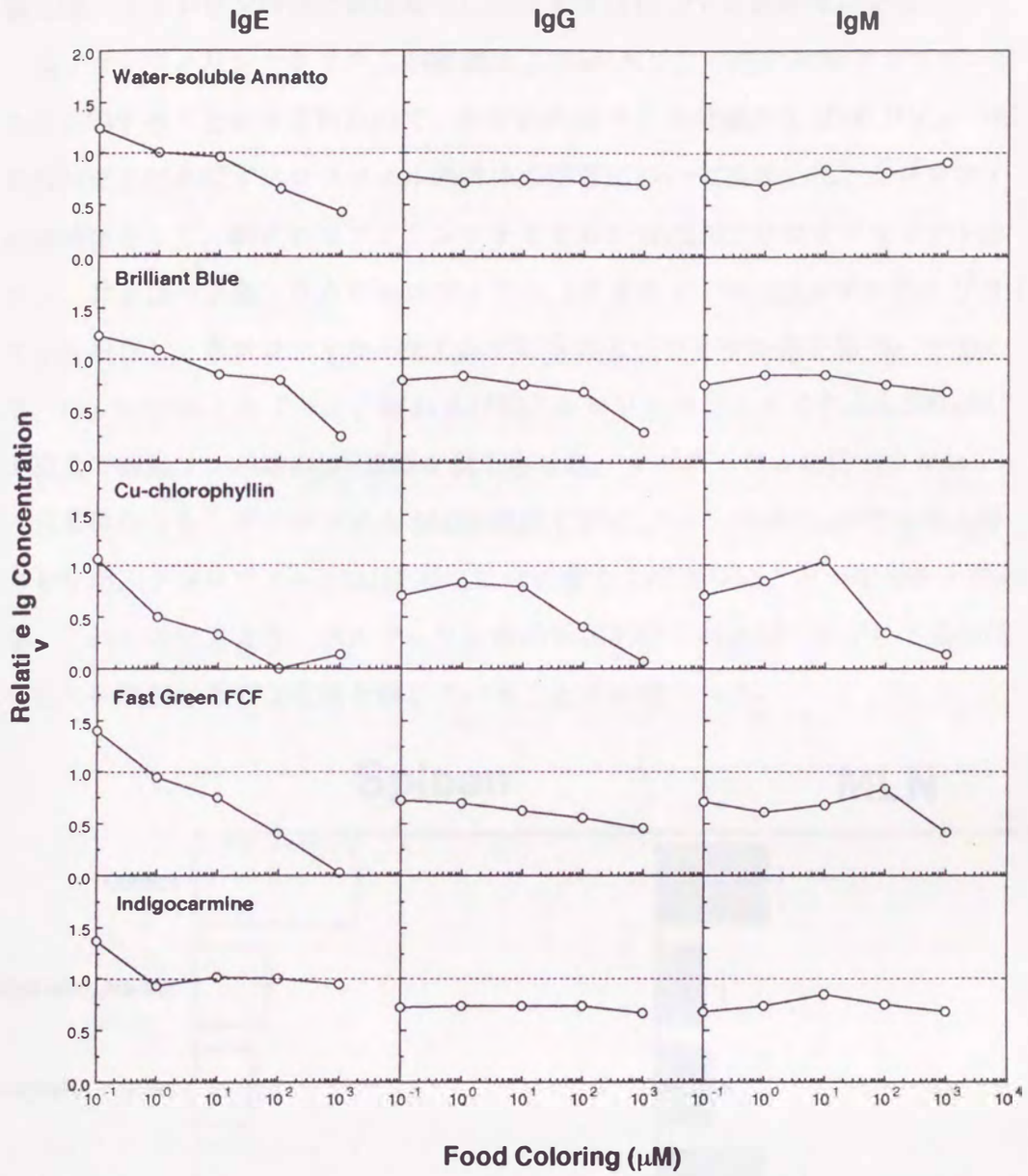


Fig. 3-4. Effect of Non-Azo Colorings on Immunoglobulin Production by Rat MLN Lymphocytes. MLN lymphocytes were cultured with various colorings such as triphenylmethane dyes (brilliant blue FCF and fast green FCF), indigoid dye (indigocarmine), water-soluble annatto and sodium Cu-chlorophyllin at around 10^{-1} to 10^{3} μM for 72 hr and the culture supernatant was collected to evaluate Ig concentration.

第5項　ラットリンパ球の抗体産生に及ぼすクロロフィル誘導体の影響

銅クロロフィリンナトリウムが脾臓およびMLNリンパ球の免疫グロブリン産生を抑制することが示されたので、われわれはラット脾臓およびMLNリンパ球の抗体産生に及ぼすクロロフィル誘導体の影響について検討した。クロロフィル誘導体として、銅クロロフィリンナトリウムの他に鉄クロロフィリンナトリウム、およびマグネシウムクロロフィリン（クロロフィル-aはメチルおよびフィチル基を有し、クロロフィル-bはアルデヒドおよびフィチル基を持つ）を選んだ。Fig. 3-5に示したように、銅および鉄クロロフィリンナトリウムは100 μMの濃度で脾臓リンパ球のIgE濃度を低下させた。マグネシウムを持つクロロフィル誘導体のうち、クロロフィル-bは脾臓およびMLNリンパ球のIgE濃度を上昇させたが、クロロフィル-aはIgE濃度には影響を及ぼさないことが明らかとなった。これらの結果より、ポルフィリン環の金属配位子およびアルデヒド基が抗体産生の調節に重要な役割を演じていることが示唆された。

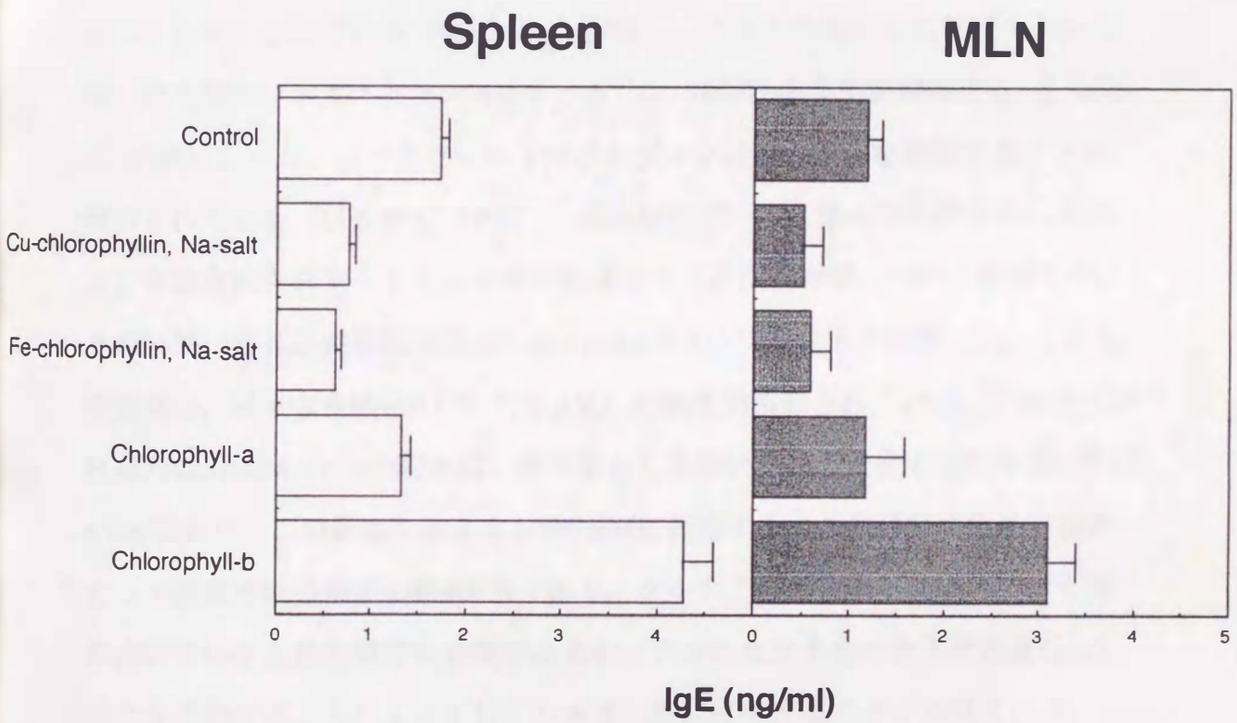


Fig. 3-5. Effect of Chlorophylls and their Derivatives on IgE producion by Rat Spleen or MLN Lymphocytes. Cells were incubated for 72 hr and culture supernatant was applied to ELISA (n=4) to measure IgE concentration. [a,b]Values in the same group without a common letter are

significantly different at $p < 0.05$.

第4節　考察

過去十数年の日本におけるアレルギー患者の増加の原因の一つとして、環境中の汚染物質が挙げられる。多くの研究者は環境中の汚染因子とアレルギー罹患率の関係について研究してきた。ディーゼル排気ガス中の微粒子（DEP）をオブアルブミン（OVA）と共に腹腔および鼻腔に投与したとき、DEPは免疫グロブリン産生に対してアジュバント効果を示すことが明らかとなった（Takafuji *et al.*, 1987, 1989; Takenaka *et al.*, 1995）。しかし、アレルギー患者の増加は、これら大気汚染物質の増加のみで説明することは出来ない。そこで、食品成分とアレルギー発症との関係について検討した。

食餌および環境アレルゲンに対するアレルギーは、おもにI型アレルギー反応、つまり、アレルゲン特異的IgEの誘導が重要な役割を演じる反応によって誘導されると考えられている（Metcalfe、1991）。クラス特異的な抗体産生調節では、胆汁酸やコンカナバリンAはラットリンパ球のIgE産生を増強する（Lim *et al.*, 1994）。一方、ポークウィードマイトジェンはその産生を抑制することが報告されている（Lim *et al.*, 1994）。本実験において、種々の天然食用色素および合成食用色素ラットリンパ球が抗体産生に及ぼす影響について検討した。その結果、各天然食用色素は1から10 μMにおいてIgE産生を抑制した。これらの色素は、様々な食物に0.1%（2-3 μM）の濃度で添加されている。クルクミンを含む*Curcuma longa*の粉末は、漢方薬として用いられるときその投与量は6-10 g/dayであり、この量はクルクミン800 μMに相当する。この濃度は食品添加物として摂食される濃度の約400倍であり、クルクミンの吸収率については不明な点が多いことを考慮する必要があるが、クルクミンを含めた天然色素はIgE産生を抑制することによって抗アレルギー的に作用することが示唆された。一方IgGおよびIgMは体液性免疫において重要な働きをする抗体である。水溶性天然色素は1 mMで、非水溶性天然色素のクルクミンは100 μMでIgGおよびIgM産生を抑制したが、10 μM以下の濃度ではその効果は認められなかった。一方、

脂溶性天然色素はIgM産生をわずか1 μMで増強した。種々の食品成分による同様なIgM産生増強効果が、ヒト-ヒトハイブリドーマおよびヒトリンパ球において報告されている（Yamada *et al.*, 1989, 1990a, 1990b, 1991; Maeda *et al.*, 1990）。今回用いた天然食用色素の免疫調節機構は明らかでないが、桂皮酸2モルからなるクルクミンはその2量体構造によって、免疫応答調節能を有することが報告された（Li *et al.*, 1993）。

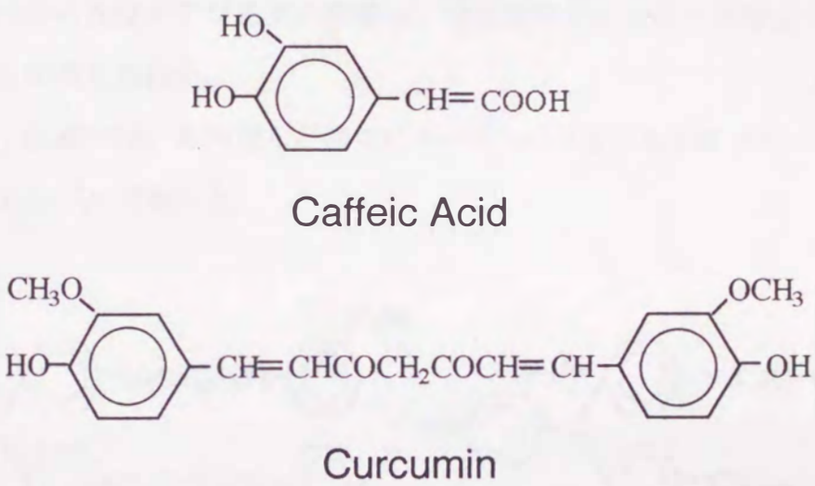


Fig. 3-6. Structure of Curcumin and Caffeic Acid.

また、ガーディニア色素の主成分であるクロシンおよびアナトー色素の主成分であるビキシンは抗酸化剤として用いられている（Escribano *et al.*, 1996; Thresiamma *et al.*, 1996; Ursini *et al.*, 1994）ので、ガーディニア色素およびアナトー色素のIgE産生抑制効果は抗酸化作用が関係していることが考えられた。今回の研究により、脂溶性食用色素は体液性免疫応答に対し、増強作用を有することが示唆された。さらに、本研究で用いられた天然食用色素は主要成分以外にも微量成分を含んでおり、これらが免疫グロブリン産生に影響を及ぼしていることも考えられる。一方、合成食用色素に関しては、アゾ色素は、脾臓リンパ球の抗体産生に対しては有意な影響を与えないものの、MLNリンパ球に対してはIgE濃度を上昇させることが示された。また、胆汁酸をIL-4もしくはIL-5

の存在下でLPSと共に添加したとき、脾臓リンパ球のIgE産生は抑制されるが、MLNリンパ球のIgE産生は増強されることが報告されている（Lim *et al.*, 1994b; 1995）。これらの結果より、食品成分に対する脾臓およびMLNリンパ球の応答はそれぞれ異なることが示唆された。さらに、病因における食品成分および食品添加物の役割と、それに関連する免疫学的変化を確立するために行われた研究で報告によると、食品添加物（タートラジンを含む）とアレルギー発症との間に相関性は認められないことが示された（Morales *et al.*, 1995）。それゆえに、全身免疫系に及ぼすアゾ色素の影響は、腸管免疫系に及ぼす影響より穏やかであることが考えられる。

非アゾ色素では、今回選んだ濃度においてIgGおよびIgMはコントロールと同じ産生レベルであった。

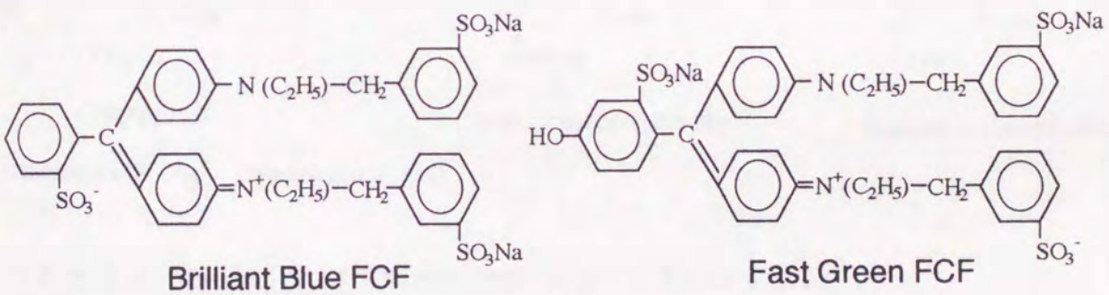


Fig. 3-7. Structure of Triphenylmethane Colorings.

一方、トリフェニルメタン色素であるブリリアントブルーFCFおよびファストグリーンFCF、さらに銅クロロフィリンナトリウムは、脾臓リンパ球では1 μM以上、MLNリンパ球では10 μM以上の濃度で脾臓およびMLNリンパ球のIgE産生を強く抑制した。また、IgE産生抑制は銅および鉄クロロフィリンによって誘導されたが、マグネシウムを配位したクロロフィリンにはその効果は認められなかった。

この結果に関して次のような報告がある。銅クロロフィリンナトリウムの毒性は遊離した二価銅イオンに由来するというものである（Worden *et al.*,

1955）。また、ヒトTおよびBリンパ球さらに単球の細胞膜は、Pb^{2+}もしくはZn^{2+}に比べてCu^{2+}によって強い傷害を受けることが走査型電子顕微鏡によって確認された（Steffensen *et al.*, 1994）。免疫グロブリンもしくは免疫応答に及ぼす銅イオンの抑制効果はモルモット（Boroskova *et al.*, 1993）およびヒト（Bumgardner *et al.*, 1993; Mehanna *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1996）においても報告されている。

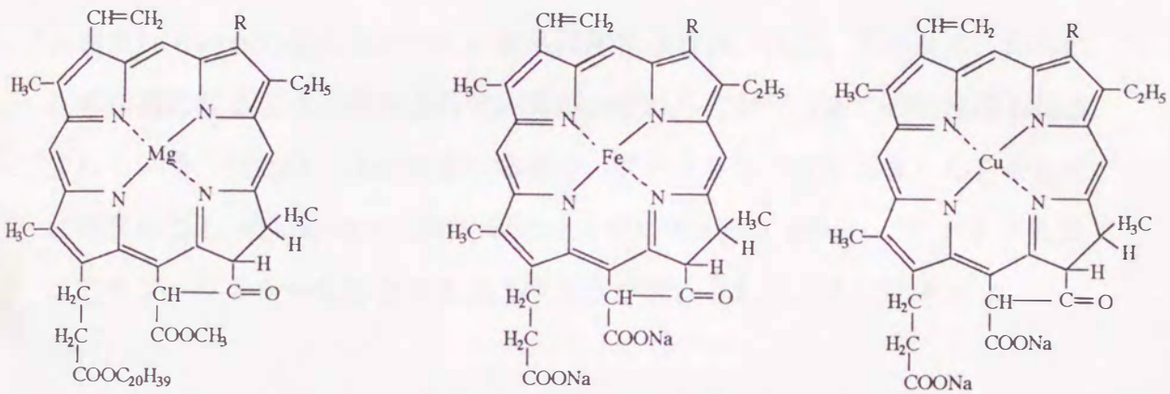


Fig. 3-8. Structure of Chlorophyll and its Derivatives.

これらの結果より、銅イオンはヒトおよびそれ以外の動物の抗体産生に重要な役割を演じることが示唆された。また、Fe^{2+}に関しては、マラリア色素から遊離した鉄は脂質の過酸化を誘導することが報告されている（Schwartzer *et al.*, 1992）。Cu^{2+}もまた不飽和脂肪酸の過酸化を促進することが報告されている（Albertini *et al.*, 1996）。これらの報告および本実験の結果より、Fe^{2+}もしくはCu^{2+}イオンによって促進された脂質過酸化がIgE産生の抑制に重要な役割を果たすことが示唆された。

第４章　香辛料の抗体産生調節機能

第１節　緒言

アレルギー反応が引き起こされるとき、一部の食品添加物がその発症に重要な役割を演じることが知られているが、その作用機構についてはほとんど明らかにされていない。日常の食生活に注目すると、多くの食品添加物や化学物質に囲まれていることに気がつく。食品添加物は着色、保存、着香など、われわれの利益になるように使用されているが、それらに対する多くの副作用も報告されている。例えば、亜硫酸塩は喘息を、タートラジンはじんましんをそれぞれ引き起こし（Tarlo *et al.*, 1993; Weber, 1993; Wuhrich, 1993）、アナトー色素はアナフィラキシー反応を引き起こすことが報告されている（Nish *et al.*, 1991）。

香辛料は食品に風味を付与するほかに腐敗や細菌の繁殖を防ぐ働きがあり（Adegoke *et al.*, 1994）、様々な保存食に利用されてきた。しかし、香辛料の免疫調節機能についてはほとんど明らかにされていない。そこで、本章においては食品中の微量成分として香辛料を選び、それらが抗体産生に及ぼす影響について検討した。　香辛料が生体に及ぼす影響についてはここ数十年間に数多くが報告されてきた。香辛料の薬理作用としては、クローブおよびガラムマサラの抗腫瘍作用（Zheng *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995）、黒胡椒および*Capsicum annum*の抗変異原性作用（Higashimoto *et al.*, 1993; Azizan, *et al.*, 1995）などが報告され、反対に副作用としては、香辛料の摂食によるアレルギー症状の惹起や（Sastre *et al.*, 1996）、赤とうがらしの摂取による皮膚炎の発症（Cooper *et al.*, 1996; Kanerva *et al.*, 1996）およびaniseedによる喘息の発症（Fraj *et al.*, 1996）などが報告されている。一方、生体の免疫機構に及ぼす影響については、ヨーロッパにおける「セロリ・ニンジン・ヨモギ・香辛料症候群」においてニンジン特異的IgEの産生に香辛料が関与することが報告されたり（Helbling *et al.*, 1993）、また香辛料中のアレルゲンが花粉や野菜中のアレルゲンと交差反

応するという報告（Niinimaki *et al.*, 1995）はあるが、抗体産生に及ぼす影響についてはほとんど報告されていない。そこで、マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす種々の香辛料の影響について検討した。

食品および環境アレルゲンに対するアレルギーは主としてⅠ型アレルギー反応により引き起こされるが、この反応においてはアレルゲン特異的IgEの誘導が重要な役割を演じる（Metcalfe, 1991）。一方、アレルゲン特異的IgAはアレルゲンの腸管吸収を阻害することによりアレルギーの発症を抑制する。また、アレルゲン特異的IgGはIgEとの競合によりⅠ型アレルギーを抑制する。そこで、本研究ではマウス脾臓リンパ球およびWEHI-279細胞の各種の抗体産生に及ぼす香辛料の影響について検討した。

第２節　実験方法

第１項　細胞調製および細胞培養

マウス脾臓リンパ球は、8週齢雄のBalb/cマウス（セアック吉富、吉富）より採取した。リンパ球を得るために、マウスをエーテル麻酔下で屠殺し、脾臓を摘出した。RPMI-1640（日水製薬、東京）培地中で脾臓をすりつぶしてリンパ球を滲出させ、Lympholyte-Mouse (Cedarlane社, Hornby, Canada)を用いて密度勾配分離法によりリンパ球画分を得た。脾臓より分離したリンパ球は、10%ウシ胎児血清（Intergen社, Purchase, NY）存在下でRPMI-1640培地（日水製薬）を用いて細胞数を2×10^6 cells/mlに調整し、5%CO_2インキュベータで72時間培養した。樹立細胞株として、九州大学医学部付属生体防御医学研究所から提供されたWEHI-279細胞を用いた。WEHI-279細胞は10%ウシ胎児血清（FBS; GIBCO BRL社, Grand Island, NY）を含むRPMI-1640培地（日水製薬）を用いて細胞数を1×10^5 cells/mlに調整し、5%CO_2環境下において継代培養した。マウス抗体の定量には、固相抗体には抗IgG抗体はヤギ抗マウスIgG（Zymed社, San Francisco, CA）を、抗IgE抗体はラット抗マウスIgE（EIU社, Brussels, Belgium）を、抗IgM抗体はウサギ抗マウスIgM $F(ab')_2$断片（Zymed社）を、

抗IgA抗体はウサギ抗マウスIgA（Zymed社）を用いた。酵素標識抗体にはペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウスIgG $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）、HRP標識ウサギ抗マウスIgM $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）およびHRP標識ウサギ抗マウスIgA（Zymed社）を用いた。またIgE定量においてはビオチン標識ラット抗マウスIgE（EIU社）、およびHRP標識ストレプトアビジン（Prozyme社, San Leandro, CA）を用いた。

第２項　香辛料のエタノール抽出液の調製

オールスパイスパウダー、オニオンパウダー、ニンニク、カレーパウダー、クローブ、黒胡椒、白胡椒、西洋わさび、シナモン、ショウガ、セージ、タイム、チリパウダー、赤とうがらし、ナツメグ、パプリカは福岡市内のスーパーマーケットで調味料として販売されている物を購入した。各香辛料1 gをホモジナイザーで挽き、これにエタノール10 mlを加えてエタノール可溶成分を30分間抽出した。このときの濃度を10 g/mlとして計算して、最大濃度（添加後の終濃度として）を100 μg/mlになるように調整した。これを0.001 μg/mlまで希釈し、Dose-response曲線を作製した。

第３項　酵素抗体法

培養上清中の免疫グロブリン濃度は酵素抗体法を用いて定量した（Yamada *et al.*, 1993）。IgGおよびIgMの定量には直接法を用い、IgEの定量にはアビジン-ビオチン法を用いた。まず、96穴イムノプレートに固相抗体を加えて37℃にて1時間保温し、TPBSで３回洗浄した。次に、ブロッキング液を加え、37℃にて１時間保温もしくは4℃にて一晩放置した後、洗浄した。これ以後の洗浄操作ではアビジン-ビオチン法で各4回、直接法で各3回行った。次に、一次抗体（サンプル上清）を加えて37℃で1時間保温し、洗浄した。IgE定量ではさらに二次抗体を加えて37℃にて1時間保温し、洗浄した。最後に、酵素標識抗体を加えて37℃で１時間保温して、洗浄液で洗浄後、基質溶液を加えて37℃で15分間反応後、反応停止液を加えて415nmで吸光度を測定した。

第３節　結果

第１項　マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす香辛料抽出液の影響

まず、マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす香辛料抽出液の影響について検討した。Table 4-1に示したように、IgM濃度に及ぼす影響については、各サンプルは終濃度10 μg/ml以下の濃度では、抗体濃度に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

Table 4-1. Dose-dependent Effect of Ethanol Extracts of Spices on IgM Production by Mouse Spleen Lymphocytes.

	Relative IgM content					
Spice	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2} μg/ml
Allspice powder	1.0	0.89	0.75	1.03	1.03	0.96
Onion powder	1.06	1.03	0.91	0.91	0.91	0.86
Garlic	1.07	0.85	0.86	0.85	0.79	0.68
Curry	1.4	1.1	1.0	1.07	1.0	0.81
Clove powder	1.2	0.91	0.82	0.88	0.89	1.05
Pepper, black	1.2	0.75	0.88	0.89	0.86	0.88
Pepper, white	1.2	0.92	1.07	0.95	0.84	0.95
Horseradish	1.1	0.91	0.95	0.93	0.79	0.91
Cinnamon	1.2	1.09	1.05	1.09	0.97	0.18
Ginger	0.94	0.88	0.90	0.79	0.68	0.32
Sage powder	1.2	0.87	0.90	0.97	0.75	0.08
Thyme powder	1.05	1.02	1.05	0.94	0.98	0.39
Chili powder	1.2	0.93	0.96	0.98	0.83	1.3
Red pepper	1.1	1.4	1.01	1.5	0.86	0.97
Nutmeg	1.1	0.86	0.86	1.01	0.85	0.47
Paprika powder	0.96	1.6	0.95	1.4	3.2	1.05

IgM concentration of the control culture was 1.3 mg/ml.

100 μg/mlにおいては、オールスパイスパウダー、オニオンパウダー、カレーパウダー、クローブ、黒胡椒、白胡椒、西洋わさび、赤とうがらし、パプリカは、抗体濃度には影響を及ぼさなかったが、ニンニクは抗体濃度をやや低下させ、シナモン、ショウガ、セージ、タイム、ナツメグは強い低下作用を示した。しかし、シナモン、セージ、タイムについては、細胞の生存率が70%以下であったことを考慮すると、この低下作用は細胞毒性によるものと考えられる。一方、チリパウダーは100 μg/mlにおいて抗体濃度を上昇させる効果が認められた。

IgG産生に及ぼす影響については、Table 4-2に示したようにオールスパイスパウダー、オニオンパウダー、ニンニク、カレーパウダー、クローブ、黒胡椒、白胡椒、西洋わさびは終濃度10 μg/ml以下の濃度では、抗体濃度を上昇させる傾向が認められた。特に、0.001 μg/mlにおいてやや強い上昇効果を示した。一方、シナモン、ショウガ、セージ、タイム、チリパウダー、赤とうがらし、ナツメグ、パプリカは抗体濃度に影響を及ぼさないことが認められた。

IgA産生に及ぼす影響においては、Table 4-3に示したようにオールスパイスパウダー、オニオンパウダー、ニンニクにおいて1 μg/ml以上の濃度で抗体濃度を上昇させるやや強い効果が認められた。それ以外の香辛料には抗体濃度には影響しなかった。ここで、シナモン、ショウガ、セージ、タイムに見られたIgA濃度低下作用はIgMのときと同様に細胞毒性が原因と思われる。

Table 4-2. Dose-dependent Effect of Ethanol Extracts of Spices on IgG Production by Mouse Spleen Lymphocytes.

	Relative IgG content					
Spice	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2} μg/ml
Allspice powder	1.7	1.2	1.3	1.2	1.4	1.5
Onion powder	1.5	1.5	1.2	1.3	1.02	1.3
Garlic	1.6	1.2	1.3	1.0	1.0	1.0
Curry	1.6	1.4	1.4	1.3	1.2	1.3
Clove powder	1.8	1.09	1.2	1.08	1.1	1.5
Pepper, black	1.6	1.09	1.04	0.94	1.1	1.02
Pepper, white	1.6	1.08	1.2	1.2	1.08	1.3
Horseradish	1.6	1.0	0.94	1.1	1.0	1.3
Cinnamon	1.2	1.1	1.09	1.06	0.98	0.22
Ginger	1.1	1.06	1.0	0.95	0.91	0.50
Sage powder	1.2	1.05	1.0	1.05	0.88	0.07
Thyme powder	1.2	1.04	1.01	1.0	1.03	0.56
Chili powder	1.2	0.96	1.02	0.97	1.02	1.04
Red pepper	1.1	0.97	0.91	0.97	0.94	1.02
Nutmeg	1.07	0.97	0.88	0.95	0.94	0.63
Paprika powder	1.08	1.02	0.91	0	1.2	1.06

IgG concentration of the control culture was 2.2 ng/ml.

Table 4-3. Dose-dependent Effect of Ethanol Extracts of Spices on IgA Production by Mouse Spleen Lymphocytes.

	Relative IgA content					
Spice	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2} μg/ml
Allspice powder	1.7	1.7	1.3	1.7	1.5	1.9
Onion powder	1.3	1.3	0.96	1.9	1.6	1.6
Garlic	1.7	1.3	0.83	1.7	1.2	1.5
Curry	1.2	1.5	0.57	1.6	1.2	1.09
Clove powder	1.3	1.09	0.7	1.3	1.2	1.09
Pepper, black	0.96	1.09	0.32	1.2	0.96	0.96
Pepper, white	1.09	0.83	0.44	1.3	0.83	0.96
Horseradish	1.3	1.2	0.44	1.09	1.09	0.96
Cinnamon	0.96	1.2	0.86	1.4	1.2	0.61
Ginger	1.2	1.3	1.0	1.2	1.01	0.77
Sage powder	0.94	1.2	1.1	1.3	1.3	0.52
Thyme powder	1.06	0.97	1.2	1.1	0.98	0.63
Chili powder	1.2	1.04	1.02	1.3	1.2	1.06
Red pepper	1.1	1.1	0.94	0.91	0.96	1.2
Nutmeg	0.91	0.98	0.97	1.01	0.97	0.59
Paprika powder	1.09	1.05	1.01	1.09	1.2	1.3

IgA concentration of the control culture was 1.1 ng/ml.

第２項　WEHI-279細胞の抗体産生に及ぼす香辛料抽出液の影響

つぎに、B細胞の抗体産生に及ぼす香辛料抽出液の影響を直接検討するために、マウスBリンパ腫WEHI-279細胞を用いて脾臓リンパ球の時と同様の実験を行った。WEHI-279細胞を培養したときの培養上清中におけるIgMおよびIgG抗体濃度を測定した。その結果、Table 4-4に示したように上清中のIgM濃度にお

いては、オールスパイスパウダーが低濃度領域においてやや上昇させる結果が得られたが、それ以外の香辛料には抗体濃度の調節効果は認められなかった。

Table 4-4. Dose-dependent Effect of Ethanol Extracts of Spices on IgM Production by WEHI-279 Cells.

	Relative IgM content					
Spice	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2} μg/ml
Allspice powder	1.3	1.3	1.2	1.3	1.2	1.2
Onion powder	1.3	1.2	1.2	1.2	1.2	1.1
Garlic	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Curry	1.2	1.2	1.1	1.2	1.06	1.09
Clove powder	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.1
Pepper, black	1.2	1.1	1.07	1.1	1.03	1.05
Pepper, white	1.2	1.2	1.08	1.1	1.03	0.96
Horseradish	1.07	1.08	1.02	1.06	0.95	1.0
Cinnamon	1.1	1.06	1.07	1.07	1.06	1.0
Ginger	1.04	1.1	1.02	1.04	0.98	0.95
Sage powder	1.06	1.05	1.01	1.08	1.0	1.0
Thyme powder	1.07	1.09	1.02	1.05	1.08	0.86
Chili powder	1.01	1.02	1.05	1.2	1.01	1.01
Red pepper	1.01	1.09	1.02	1.05	1.0	1.0
Nutmeg	1.06	1.1	1.05	1.08	1.0	0.92
Paprika powder	1.02	1.04	0.98	1.06	1.0	0.94

IgM concentration of the control culture was 5.4 mg/ml.

一方、IgG濃度においては、Table 4-5に示したように各香辛料抽出液は低濃度領域において上昇させる効果を有することが明らかとなった。シナモン、ショウガ、セージ、タイムは0.001 μg/mlにおいて特に強く上昇させることが確認された。しかし、WEHI-279細胞の抗体産生に及ぼす香辛料の影響は、マウス脾臓リンパ球ほど強くは認められなかった。

Table 4-5. Dose-dependent Effect of Ethanol Extracts of Spices on IgG Production by WEHI-279 Cells.

	Relative IgG content					
Spice	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	10^{0}	10^{1}	10^{2} μg/ml
Allspice powder	1.3	1.2	1.2	1.2	0.97	1.1
Onion powder	1.3	1.2	1.2	1.1	1.08	1.01
Garlic	1.3	1.2	1.1	1.1	1.07	1.02
Curry	1.2	1.2	1.1	1.1	1.05	1.01
Clove powder	1.2	1.1	1.09	1.08	1.04	1.0
Pepper, black	1.2	1.1	1.06	1.05	0.97	0.94
Pepper, white	1.2	1.09	1.02	1.03	1.0	0.81
Horseradish	1.2	1.1	1.09	1.05	1.01	1.04
Cinnamon	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.3
Ginger	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3	1.2
Sage powder	1.5	1.4	1.3	1.3	1.2	1.0
Thyme powder	1.4	1.3	1.1	1.2	0.97	0.71
Chili powder	1.4	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2
Red pepper	1.3	1.1	1.1	1.02	1.04	1.08
Nutmeg	1.2	1.2	1.0	1.0	1.04	1.0
Paprika powder	1.02	1.04	0.98	1.06	1.0	0.94

IgG concentration of the control culture was 12.8 ng/ml.

第3項　マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼすオイゲノールの影響

多くの香辛料には脂溶性物質であるオイゲノールが含まれている。本実験において見出されたセージ、タイムの抗体産生調節活性に対してオイゲノールがどのように関与しているかを検討した。オイゲノールを10^{-5}～10^{3} μMの濃度でマウス脾臓リンパ球に添加し、10%FBS含有RPMI-1640培地で培養した。72時間培養後の上清中抗体濃度を酵素抗体法で測定した。その結果、Table 4-6に示したように、オイゲノールには抗体産生調節活性は認められなかった。100 μM以上の濃度における各抗体濃度の低下作用は脾臓リンパ球の生存率が50%以下であったことから、細胞毒性によるものであると考えられた。

Table 4-6. Dose-dependent Effect of Eugenol on Immunoglobulin Production by Mouse Spleen Lymphocytes.

Sample	Concentration (μM)	Relative Ig content		
		IgM	IgG	IgA
Control	0	1.0	1.0	1.0
Eugenol	10^{-5}	1.1	1.1	1.0
	10^{-4}	1.1	1.1	1.0
	10^{-3}	1.0	1.0	1.0
	10^{-2}	1.2	1.1	1.0
	10^{-1}	1.1	1.1	1.0
	10^{0}	1.2	1.2	1.1
	10^{1}	1.3	1.3	1.1
	10^{2}	0.8	1.1	0.8
	10^{3}	0	0	0

Ig concentrations of the control culture were 7.5 μg/ml for IgM, 164.5 ng/ml for IgG and 91.7 ng/ml for IgA.

第4項　WEHI-279細胞の抗体産生に及ぼすオイゲノールの影響

マウス脾臓リンパ球において、オイゲノールは抗体産生に影響を及ぼさないことが示された。脾臓リンパ球はTおよびBリンパ球の混合細胞系であるので、

オイゲノールが直接B細胞に与える影響についてはまだ未解明であった。そこで、本実験において見出されたセージ、タイムの抗体産生調節活性に対してオイゲノールがどのように関与しているかを検討するため、オイゲノールを10^{-3}～10^{3} nMの濃度でWEHI-279細胞に添加し、10%FBS含有RPMI-1640培地で培養した。72時間培養後の上清中抗体濃度を酵素抗体法で測定した。その結果、Table 4-7に示したように、10 nM以下の濃度においてはオイゲノールは抗体濃度に影響しないことが認められた。一方、100 nM以上ではオイゲノールの毒性によって抗体濃度は著しく低下した。この結果より、オイゲノールには抗体産生調節効果は認められず、香辛料の抗体産生調節活性はそれ以外の成分に依存することが示唆された。

Table 4-7. Dose-dependent Effect of Eugenol on Immunoglobulin Production by WEHI-279 Cells.

Sample	Concentration (nM)	Relative Ig content	
		IgM	IgG
Control	0	1.0	1.0
Eugenol	10^{-3}	1.0	0.9
	10^{-2}	0.9	1.1
	10^{-1}	0.9	1.1
	10^{0}	1.0	1.2
	10^{1}	0.9	1.1
	10^{2}	0.1	0.2
	10^{3}	0	0

Ig concentrations of the control culture were 24.7 μg/ml for IgM and 11.3 ng/ml for IgG.

第4節　考察

抗体産生に及ぼす食品中の微量成分の影響を検討するにあたり、第3章においてわれわれは抗体産生に及ぼす食用色素の影響について論じた。本章においては、微量成分として香辛料を選び、それらが抗体産生に及ぼす影響について検討した。香辛料は食品に風味を付与するほかに腐敗や細菌の繁殖を防ぐ働きがあることから（Adegoke *et al.*, 1994）、様々な保存食に利用されるとともに、香辛料が生体に及ぼす影響についてはここ数十年間に数多くの報告がなされてきた。香辛料の薬理作用としては、クローブおよびガラムマサラの抗腫瘍作用（Zheng *et al.*, 1992; Rao *et al.*, 1995）、黒胡椒および*Capsicum annum*の抗変異原性作用（Higashimoto *et al.*, 1993; Azizan, *et al.*, 1995）などが報告され、反対に副作用としては、香辛料の摂食によるアレルギー症状の惹起や（Sastre *et al.*, 1996）、赤とうがらしの摂取による皮膚炎の発症（Cooper *et al.*, 1996; Kanerva *et al.*, 1996）およびaniseedによる喘息の発症（Fraj *et al.*, 1996）などが報告されている。

一方、生体の免疫機構に及ぼす影響については、ヨーロッパにおける「セロリ・ニンジン・ヨモギ・香辛料症候群」においてニンジン特異的IgEの産生に香辛料が関与することが報告されたり（Helbling *et al.*, 1993）、また香辛料中のアレルゲンが花粉や野菜中のアレルゲンと交差反応するという報告（Niinimaki *et al.*, 1995）はあるが、抗体産生に及ぼす影響についてはほとんど報告されていない。そのため、はじめにわれわれはマウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす種々の香辛料の影響について検討した。その結果、オールスパイスパウダー、オニオンパウダー、ニンニクにIgGおよびIgA産生を増強し、カレーパウダー、クローブ、黒胡椒、白胡椒、西洋わさびにIgG産生を増強する傾向が明らかとなった。また、シナモン、ショウガ、セージには強い細胞毒性が認められた。この細胞毒性は、香辛料によるDNA修飾誘導（Randerath *et al.*, 1993）によって起こった可能性が考えられ、今後の検討が必要である。

多くの香辛料は抗酸化成分を含んでおり、たとえばオールスパイスおよびク

ローブのメタノール抽出物はヒドロキシラジカルを除去することにより、N-α-*t*-butoxycarbonyl-fructoselysineおよびN-α-*t*-butoxycarbonyl-arginineのpentosidine形成を抑制することが報告されている（Oya *et al.*, 1997）。したがって、香辛料は生体内において発生したラジカルを捕捉し、抗体産生を調節することが考えられる。しかし、WEHI-279細胞においては香辛料は強い抗体産生調節機能を示さないことから、香辛料の抗体産生調節作用にはT細胞由来のサイトカインおよび細胞間の相互作用の関与が考えられる。また、香辛料中の脂溶性成分の含有率は0.1から5.2%であることから、本実験において細胞に香辛料のエタノール抽出物を添加したとき、細胞に対して約30 nMのオイゲノールを添加したものと換算された。しかし、オイゲノールは抗体産生に影響を及ぼさなかったことから、オイゲノール以外の成分に活性が存在することが示唆された。

第５章　ローズベンガルの抗体産生調節機構の解析

第１節　緒論

日本人の生活スタイルおよびわれわれをとりまく環境は過去40年で大きく変わった。ディーゼル排気ガス中の微粒子がアジュバント効果を示すとの報告（Muranaka *et al.*, 1986; Takafuji *et al.*, 1987, 1989; Takenaka *et al.*, 1995）や、タバコの副流煙を慢性的にラットに吸引させると、胸腺依存的および非依存的抗原に対する抗体産生細胞の応答が抑制され、機能不全に陥るとの報告（Savage *et al.*, 1991）があり、これらの環境変化（悪化）がアレルギー患者を増加させた原因の一つとして考えられている。

一方、食生活に視点を移すと多くの食品添加物や化学物質に囲まれているのに気づく。食物がわれわれの手元に届くまで、害虫の駆除や輸送中の品質劣化を防ぐために多くの種類の農薬が用いられている。また、食品添加物が着色、保存、着香などのために用いられる。しかし、いくつかの食品添加物においては、摂食したときに副作用を引き起こす数多くの事例が報告されている。例えば、保存料である亜硫酸塩は喘息を引き起こし、着色料であるタートラジンはじんましんを誘発することが知られており、さらにアナトー色素はアナフィラキシー反応を引き起こすといわれている（Nish *et al.*, 1991; Tarlo *et al.*, 1993; Weber 1993; Wuthrich *et al.*, 1993）。しかし、ここに挙げた添加物を含めても、添加物の副作用は数例しか知られておらず、それらの添加物がアレルギーにいたらしめるメカニズムについてはほとんどが分かっていない。そこで、アレルギー反応に及ぼす食品添加物の影響について検討することにした。

通常４つに分類されるアレルギー反応の中で、Ｉ型アレルギーは食品成分や、大気中の抗原物質に対するアレルギー誘導に重要な役割を演じている（Metcalfe 1991）。Ｉ型アレルギーの特徴として、アレルギー特異的IgEの誘導が挙げられるが、健常人ではアレルゲン特異的IgGが競合することによりアレルギー反応は抑制される。クラス特異的抗体産生の調節は、IL-4、IL-5、IFN-

α、IFN-γにより誘導されることが知られている（Elson *et al.*, 1994; Gauchat *et al.*, 1991; Ochel *et al.*, 1991; Pene *et al.*, 1988; Rousset *et al.*, 1991）が、同様なクラス特異的調節は胆汁酸やレクチンでも誘導される（Lim *et al.*, 1994a, 1994b; Yamada *et al.*, 1993）。胆汁酸は1 mM以上の濃度でラット腸間膜リンパ節（MLN）リンパ球のIgE産生を増強し、IgA、IgGおよびIgM産生を抑制する（Lim *et al.*, 1994b）。また、コンカナバリンA（Con A）はIgE産生を増強し、アメリカヤマゴボウレクチン（PWM）は逆に抑制する一方、それ以外のクラスの抗体産生には影響を及ぼさないことが報告されている（Lim *et al.*, 1994b）。これらの背景に立ち、食品添加物の抗体産生調節機能について検討を行った。

第２節　実験方法

第１項　試薬

アシッドレッド、ボルドーS、ジクロロフルオレセイン、エオシンY、フルオレセイン、エリスロシン、フロキシン、ローズベンガル、タートラジン、酢酸エチル、亜硝酸ナトリウム、L-チロシンおよび3, 5-ジヨード-L(+)-チロシンは和光純薬工業（大阪）より購入した。3-ヨード-L-チロシン、3, 3', 5-トリヨード-L-サイロニン、L-チロキシンナトリウム５水和物およびジヨードフルオレセインはAldrich社（St. Louis, MO）より購入した。ジブロモフルオレセイン、エオシンBはJanssen Chimica社（Brussels, Belgium）より購入した。　酵素抗体法に用いる試薬として、洗浄液には、0.05% Tween 20含有PBS（TPBS）を、ブロッキング液にはBlock Ace（大日本製薬、大阪）を用いた。ラット抗体の場合、固相抗体には抗IgG抗体はヤギ抗ラットIgGアフィニティー精製 $F(ab')_2$断片（Cappel社, West Chester, PA）を、抗IgE抗体はヤギ抗ラットIgEFc領域アフィニティー精製7S画分（Nordic Immunology社, Tilburg, Netherlands）を、抗IgM抗体はヤギ抗ラットIgMアフィニティー精製 $F(ab')_2$断片（Zymed社, San Francisco, CA）を用いた。酵素標識抗体はペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ

抗ラットIgGアフィニティー精製 $F(ab')_2$ 断片（Cappel社）およびHRP標識ヤギ抗ラットIgMアフィニティー精製 $F(ab')_2$ 断片（Cappel社）を用いた。またIgE定量においてはビオチン標識マウス抗ラットIgE（Zymed社）、およびHRP標識アビジン（DAKOPATTS社, Copenhagen, Denmark）を用いた。マウス抗体の定量には、固相抗体には抗IgG抗体はヤギ抗マウスIgG（Zymed社）を、抗IgE抗体はラット抗マウスIgE（EIU社, Brussels, Belgium）を、抗IgM抗体はウサギ抗マウスIgM $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）を、抗IgA抗体はウサギ抗マウスIgA（Zymed社）を用いた。酵素標識抗体にはペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗マウスIgG $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）、HRP標識ウサギ抗マウスIgM $F(ab')_2$ 断片（Zymed社）およびHRP標識ウサギ抗マウスIgA（Zymed社）を用いた。またIgE定量においてはビオチン標識ラット抗マウスIgE（EIU社）、およびHRP標識ストレプトアビジン（Prozyme社, San Leandro, CA）を用いた。

第２項　細胞調製および細胞培養

実験動物には、９週齢雄Brown Norwayラット（セアック吉富、吉富）を用いた。餌はMF（オリエンタル酵母、東京）を用いた。ラットは購入後直ちに実験に供するか、数日予備飼育してから実験に用いた。予備飼育の際は、ラット用ケージにおがくず床（ホワイトフレーク：オリエンタル酵母）を敷いて飼育した。

ラットリンパ球は、Lim *et al.*（1994a）の方法に従って調製した。まず、ラットをエーテル麻酔下で屠殺し、脾臓および腸間膜リンパ節（MLN）を摘出した。次に、RPMI-1640（日水製薬、東京）培地中で脾臓およびMLNをすりつぶしてリンパ球を分離させ、Lympholyte-Rat（Cedarlane社, Hornby, Canada）を用いて密度勾配分離法によりリンパ球画分を得た。ラットより分離した各リンパ球の培養では10%ウシ胎児血清（Intergen社, Purchase, NY）含有RPMI-1640培地を用いて 2×10^5 cells/mlに調整し、IgE定量においては6時間、IgGおよびIgM定量においては72時間、10%CO_2インキュベータ中で培養後、上清を回収し、抗体濃度の測定を行った。

マウスBリンパ腫WEHI-279細胞は、九州大学医学部付属生体防御医学研究所より提供された。WEHI-279細胞の調整については、10%ウシ胎児血清（FBS; GIBCO BRL社, Grand Island, NY）を含むRPMI-1640培地を用いて、5%CO_2環境下において継代培養した。実験に供するとき、細胞濃度は1×10^5 cells/mlに調整した。培養上清中の抗体価は酵素抗体法を用いて定量した。

第３項　酵素抗体法

抗体価の測定は、Yamada *et al.*（1993）の方法に従って行った。IgGおよびIgMの定量には直接法を用い、IgEの定量にはアビジン-ビオチン法を用いた。まず、96穴イムノプレートに固相抗体を加えて37℃にて1時間保温し、TPBSで３回洗浄した。次に、ブロッキング液を加え、37℃にて１時間保温もしくは4℃にて一晩放置した後、洗浄した。これ以後の洗浄操作ではアビジン-ビオチン法で各4回、直接法で各3回行った。次に、一次抗体（サンプル上清）を加えて37℃で1時間保温し、洗浄した。IgE定量ではさらに二次抗体を加えて37℃にて1時間保温し、洗浄した。最後に、酵素標識抗体を加えて37℃で１時間保温して、洗浄液で洗浄後、基質溶液を加えて37℃で15分間反応後、反応停止液を加えて415nmで吸光度を測定した。

第４項　遺伝子増幅法

目的遺伝子の発現を確認するために、RT-PCR法を用いた。操作は次のように行った。はじめに、WEHI-279細胞から全RNAを抽出した。10^7個の細胞をPBSで洗浄後、ペレット状の細胞にTRIzol（GIBCO BRL社）を加え、取り扱い説明書に従って全RNAを分離した。分離したRNAを75%エタノールで洗い、つづいて水に溶解させた。10 μgのRNAを逆転写酵素（United States Biochemical社, Cleveland, OH）を用いて分離したRNAに対して相補的DNA（cDNA）を作製した。

つぎに、目的遺伝子に対するプライマー（九州大学医学部付属生体防御医学研究所から提供された）を用いて目的遺伝子を増幅した。反応液には、0.4

unitsのTaqポリメラーゼ（Fermentas社, Vilnius, Lithuania）、それぞれ2.5 mMのデオキシリボヌクレオチド三リン酸を含む溶液、200 μMのプライマーおよび10 μMのcDNAを混合させた溶液を用い、これに取扱説明書に従って緩衝液および塩化マグネシウム溶液を加えた。最後に、Gene Amp PCR system 2400（Perkin Elmer社, Foster City, CA）を用いて目的遺伝子を増幅した。

PCR産物は、2%アガロースゲル（Sawady Technology社、東京）を用いて電気泳動し、臭化エチヂウム（和光純薬工業）でDNAを染色し、紫外線によって得られた画像をKodak Digital Science（Eastman Kodak社, Rochester, NY）で撮影した。

第５項　統計計算

得られた結果は、Duncanの統計計算法（Duncan, 1955）に従って有意差検定を行った。

第３節　結果

第１項　ラット脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼすキサンテン色素の影響

ラットリンパ球の抗体産生に及ぼす種々の食品添加物の影響を検討するため、以下の方法に従って実験を行った。ラット脾臓もしくは腸間膜リンパ節（MLN）リンパ球を10%FBS含有RPMI-1640培地で培養し、培養上清中の抗体濃度を定量すると、IgE濃度は培養後4から6時間でピークに達してその後急速に低下し、IgGおよびIgM濃度は培養後24から72時間でピークに達しその後抗体濃度の上昇が停止することが報告されている（Lim *et al.*, 1994a, 1994b）。そこで、ラット脾臓リンパ球を香料（酢酸エチル）、保存料（亜硝酸ナトリウム）および着色料（タートラジン、ボルドーＳおよびローズベンガル）存在下で培養し、IgE濃度の定量では6時間後、IgGおよびIgM濃度の測定では72時間後の培養上清を採取し、その抗体濃度を酵素抗体法で定量した。その結果、Fig. 5-1に示したように、50 μMのローズベンガルはIgE濃度を上昇させ、50 μM以上でIgGおよびIgM濃度を低下させることが明らかとなった。このときの細胞の生

存率は90%以上であったことから、この抗体産生調節作用は細胞毒性によるものではないことが示された。それ以外の添加物はIgE濃度には影響を及ぼさなかったが、10 mMにおいてIgGおよびIgM濃度を低下させた。この濃度は、ローズベンガルが効果を示した濃度（50 μM）の200倍に相当することから、ローズベンガルが抗体産生に最も強く影響を及ぼすことが示唆された。

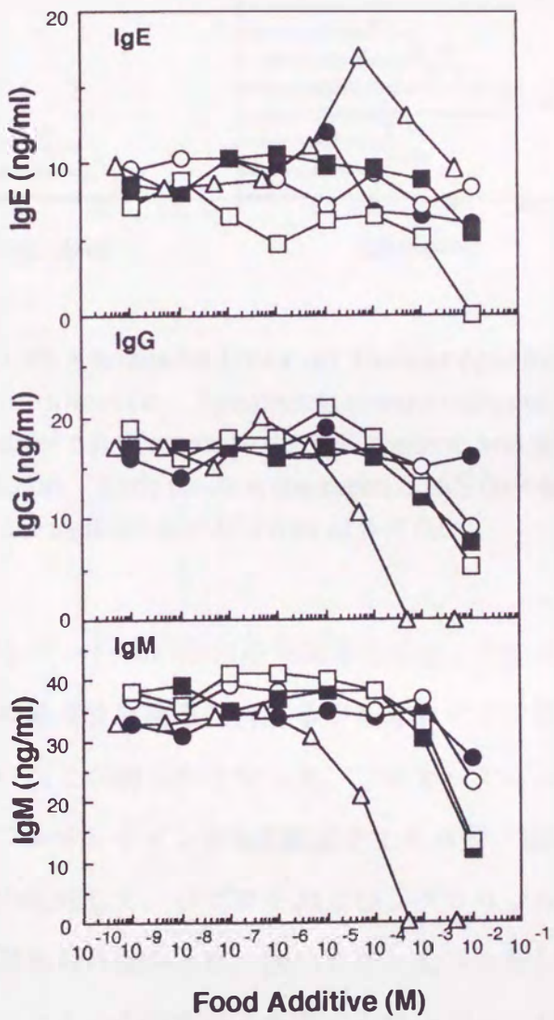


Fig. 5-1. Dose-dependent Effect of Food Additives on Immunoglobulin Production by Rat Spleen Lymphocytes. Lymphocytes were cultured in the presence of various concentrations of ethyl acetate (●), sodium nitrite (○), tartrazine (■), Bordeaux S (□) or Rose Bengal (△) for 6 h to measure the IgE content, and for 72 h to measure the IgG and IgM contents.

ローズベンガルの構造と抗体産生調節効果との相関関係を検討するために、ラット脾臓リンパ球を種々のキサンテン色素と共に6もしくは72時間培養し、培養上清中の抗体濃度を酵素抗体法で定量した。この条件下では、細胞の生存率は全培養期間にわたり90%以上であった。

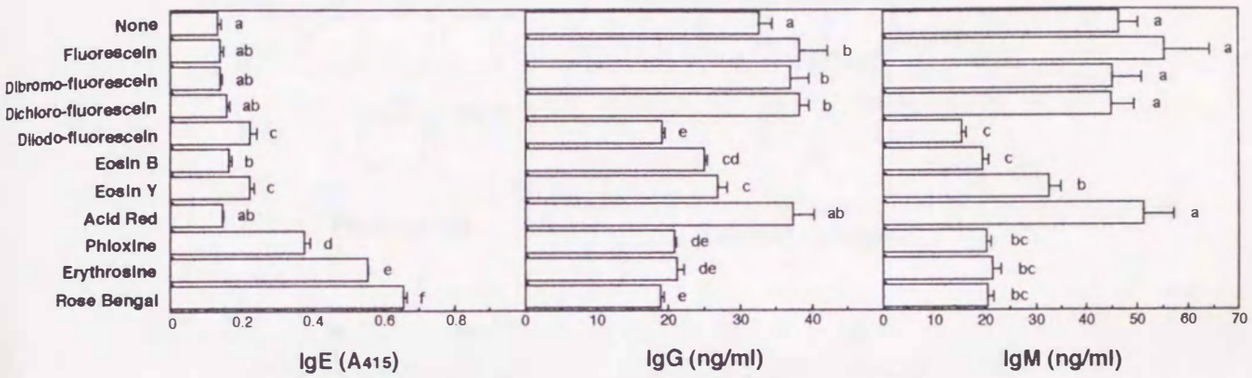


Fig. 5-2. Effect of Xanthene Dyes on Immunoglobulin Production by Rat Spleen Lymphocytes. Lymphocytes were cultured in the presence of 100 μM xanthene dyes for 6 h to measure the IgE content, and for 72 h to measure the IgG and IgM contents. Each result is the mean ± SE (n=4), and $^{a\text{-}f}$values without a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

Fig. 5-2にキサンテン色素の抗体産生調節作用を、Fig. 5-3にその構造を示した。キサンテン色素の基本骨格構造を有するフルオレセインには抗体濃度に対して影響を及ぼさないことが明らかとなった。フルオレセインの二ハロゲン化物のうち、ジヨードフルオレセインがIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を有意に低下させたのに対して、ジブロモおよびジクロロフルオレセインには抗体濃度調節作用は認められなかった。四ハロゲン化フルオレセインに関しては、４つのヨウ素原子と４つの塩素原子を有するローズベンガルが最も強くIgE濃度を上昇させ、４つのヨウ素原子を有するエリスロシンもそれにつづく濃度上昇効果を示した。一方、４つの臭素原子と４つの塩素原子を有するフロキシンのIgE濃度上昇効果は、ローズベンガルおよびエリスロシンよりもずっと低いものであった。さらに、IgE濃度は４つの臭素原子を有するエオシンＹおよび

2つの臭素原子と2つのニトロ基を有するエオシンBによっても上昇した。IgGおよびIgM濃度に関しては、ジブロモおよびジクロロフルオレセインを除くハロゲン化フルオレセインは濃度低下作用を有することが示されたが、一方で非ハロゲン化フルオレセインであるアシッドレッドにはその効果が認められなかった。

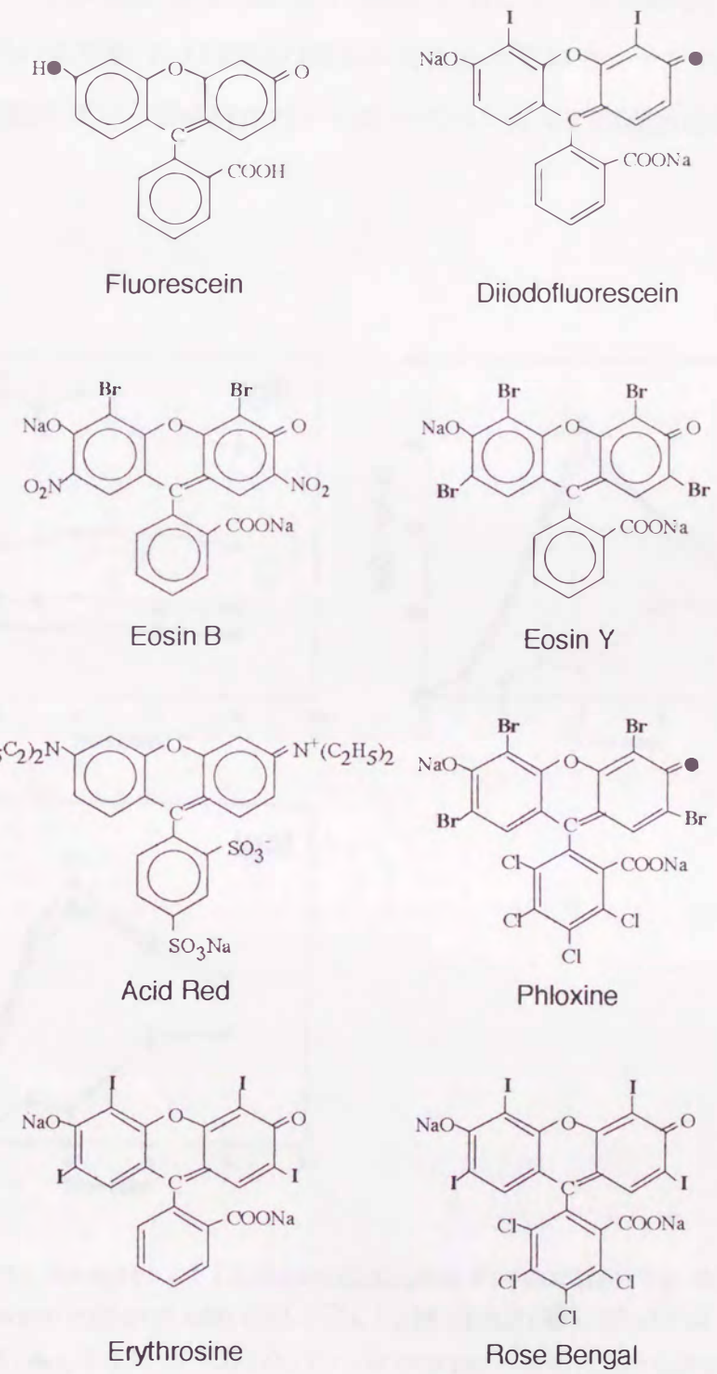


Fig. 5-3. Structure of Xanthene Dyes.

第２項　WEHI-279細胞の抗体産生に及ぼすローズベンガルの影響

第１項において、ラット脾臓リンパ球をキサンテン色素であるローズベンガルと共に培養したとき、ローズベンガルは培養上清中のIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を低下させる作用を有することを明らかにした。第２項においては、この作用機構を明らかにするために次のような実験を行った。脾臓リンパ球を用いた実験ではT細胞の関与が考えられるので、マウスBリンパ腫WEHI-279細胞を用いてB細胞に対するローズベンガルの直接的な影響を検討した。

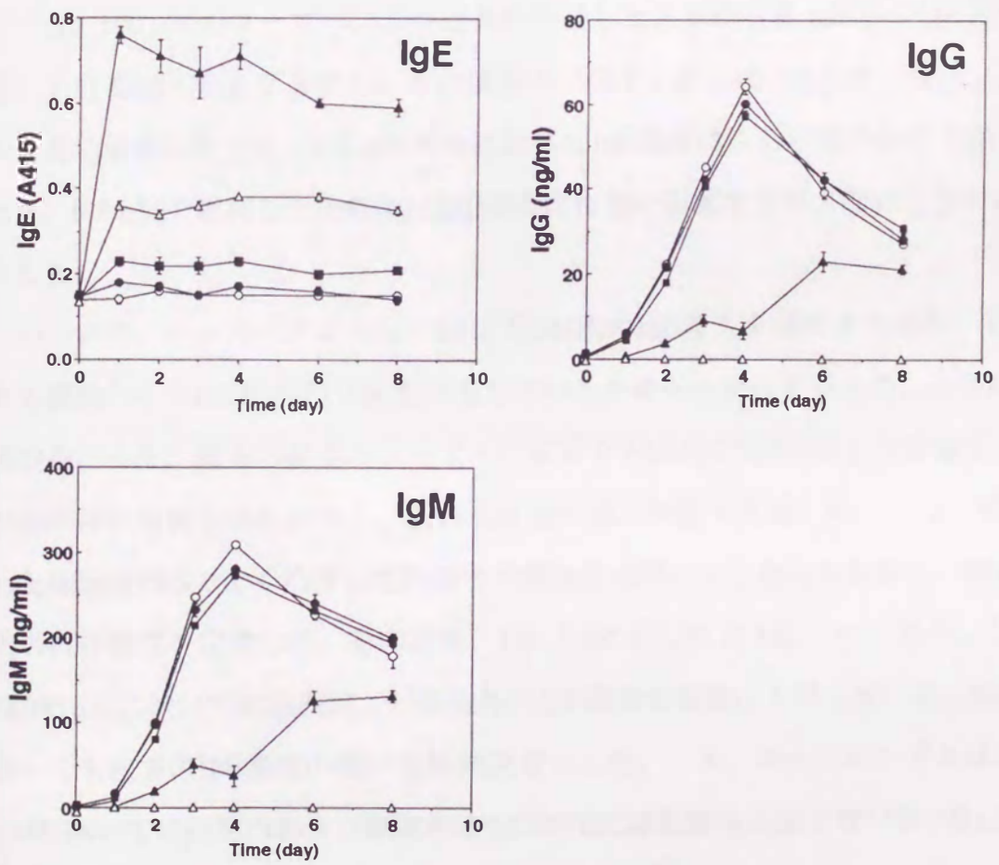


Fig. 5-4. Time-courses of Immunoglobulin Production by WEHI-279 Cells. Cells were cultured with PBS (○), 1 μM of RB (●), 10 μM of RB (■), 100 μM of RB (▲), 1 mM of RB (△) for various periods and the culture supernatant was collected to measure the Ig concentrations by ELISA. The results indicated here were the mean ± SE (n=3).

まず、WEHI-279細胞をローズベンガルと共に培養したときの培養上清中の抗体濃度を酵素抗体法により経時的に測定した。ローズベンガルを100 μM以内の濃度で添加したとき細胞の生存率は90%以上であったが、1 mMで添加したときには生存率は0%であった。この結果から、以下の実験では100 μM以内で添加した。

Fig. 5-4に示したように、0-10 μMのローズベンガルを添加したとき、上清中のIgG濃度は4日後に60 ng/ml、また、IgM濃度はIgGと同じく4日後に300 ng/mlまで達し、その後両抗体濃度は低下した。100 μMのローズベンガルを添加したとき、IgGおよびIgM濃度は培養後8日以内では穏やかに増加することが確認された。

一方、100 μMのローズベンガルと共に培養したときの培養上清中のIgE濃度は、1日で0.8 ODまで上昇し、その後徐々に低下した。10 μMのローズベンガルと共に培養したとき、100 μMの時に比べてIgE濃度はさらに穏やかに上昇したが、0-1 μMで添加したときにはIgE濃度には強い影響を及ぼさないことが示された。

つづいて、ローズベンガルはWEHI-279細胞のIgE産生を増強するのか、それとも細胞からのIgE抗体の分泌を促進しているかを明らかにするため、以下の実験を行った。種々の濃度のローズベンガルをWEHI-279細胞と共に培養し、24時間後に培養上清を回収し、抗体濃度を酵素抗体法で定量した。一方、培養した細胞をPBSでよく洗浄してPBS中で超音波処理により細胞を破砕し、細胞内の抗体濃度を定量した。その結果、Fig. 5-5に示したように、ローズベンガルは100 μMにおいて細胞内および細胞外のIgE濃度を有意に上昇させ、10 μMにおいても双方のIgE濃度の弱い上昇効果を示した。一方、ローズベンガルは1-10 μMにおいては細胞内および細胞外のIgG濃度には影響を及ぼさないが100 μMでは細胞内のIgG濃度をやや低下させた。これらの結果によりローズベンガルは100 μMにおいて、WEHI-279細胞からのIgEの分泌を促進するのではなく、IgE産生を促進していることが示唆された。

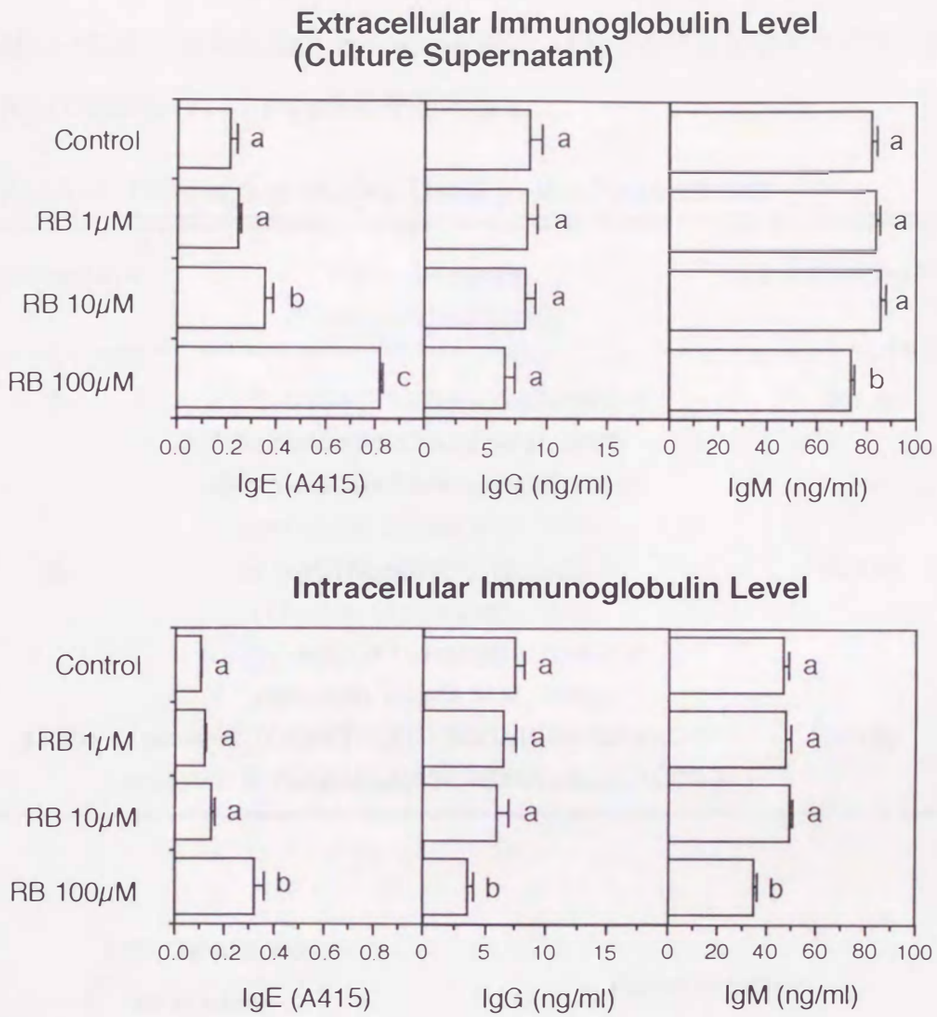


Fig. 5-5. Effect of RB on Intracellular and Extracellular Immunoglobulin Levels of WEHI-279 Cells. Cells were cultured for 24 h in the absence or presence of RB and the Ig concentration in the culture supernatant were determined (for result of A) or were lysed by sonication to determine the Ig concentration in the cells (for result of B) by ELISA. $^{a\text{-}c}$Values in the same group without a common letter are significantly different at $p < 0.05$ (n= 5).

第３項　WEHI-279細胞のIgE遺伝子の発現に及ぼすローズベンガルの影響

次に、ε遺伝子の発現に及ぼすローズベンガルの影響について検討した。WEHI-279細胞をローズベンガルと共に72時間培養し全RNAを細胞から分離した。その後、プロダクティブεmRNA（Pε）およびIgMからIgEへのクラススイッ

チの際に発現が認められるε鎖の胚型転写物（Gε）の発現を検討するために Table 5-1に示したようなプライマーを用い、Fig. 5-6のようなスケジュールに従ってRT-PCR法を行い、目的遺伝子を増幅した。

Table 5-1. Primer Sequences Used in the Experiment.

Amplified RNA	Primer Sequence (Position and Reference)	Size of Amplified Product
Pε	J_{H4}: 5'-TGGACTACTGGGGTCAAGG-3' (no numbered, Gough *et al.*, 1981) Cε2: 5'-AGCGATGAATGGAGTAGC-3' (991-1008, Ishida *et al.*, 1982)	365 bp
Gε	Iε: 5'-ACTAGAGATTCACAACG-3' (771-778, Gerondakis, 1990) Cε2: 5'-AGCGATGAATGGAGTAGC-3' (991-1008, Ishida *et al.*, 1982)	423 bp
β-Actin	sense: 5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3' antisense: 5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	348 bp

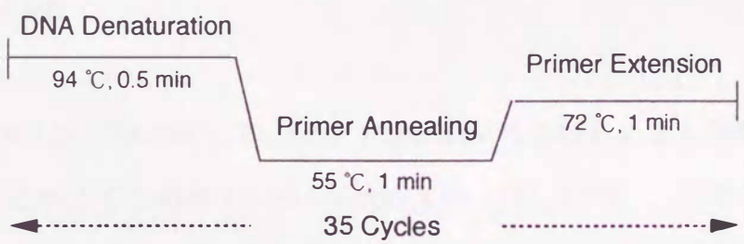


Fig. 5-6. RT-PCR Schedule.

ハウスキーピング遺伝子にはβ-actinを用いてcDNAの作製が成功したかの指標とした。用いたプライマーはTable 5-1に示した。その結果、Fig. 5-7に示したように、1-100 μMのローズベンガルはWEHI-279細胞のPεの発現を増強することが認められた。一方、WEHI-279細胞のGεはローズベンガルの添加に関わらず弱く発現しており、Gεの発現にはローズベンガルの影響が認められなかった。

以上の結果より、ローズベンガルはWEHI-279細胞のPεの発現を増強しIgE産生を促進するが、Gεの発現には影響を及ぼさないことからIgMからIgEへのクラススイッチを促進しないことが示唆された。

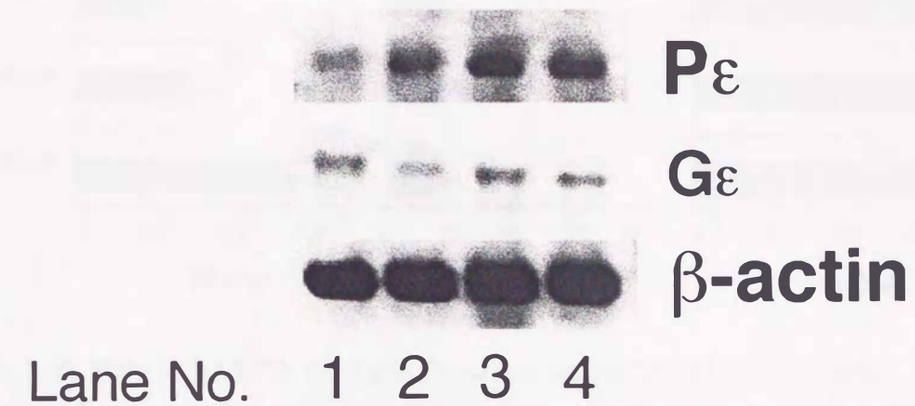


Fig. 5-7. Effect of RB on the Expression of Pε or Gε of WEHI-279 Cells. Cells were cultured for 72 h in the presence or absence of RB at each concentration and RNA was extracted from the cells to apply to RT-PCR. Each lane indicates; Lane 1: Control (PBS); Lane 2: 1 μM RB; Lane 3: 10 μM RB; Lane 4: 100 μM RB.

LPSはBリンパ球に対して、マイトジェン活性をはじめとする様々な影響を及ぼすことがよく知られている（Gronowicz *et al.*, 1974）。そこでWEHI-279細胞にLPSとローズベンガルを同時に添加したときの、抗体産生に及ぼす影響について検討した。WEHI-279細胞をLPS（2.5 μg/ml）およびローズベンガル（0-100 μM）と共に48時間培養し、培養上清中の抗体濃度を酵素抗体法で定量した。

その結果、Fig. 5-8に示したように、LPSはWEHI-279細胞のIgE産生をやや抑制することが認められたが、ローズベンガルによるIgE産生増強作用を打ち消すことは出来なかった。一方、0-10 μMのローズベンガルを添加したとき、LPSはWEHI-279細胞のIgGおよびIgM産生に強い影響を及ぼさないことが示されたが、100 μMのローズベンガル添加によるIgGおよびIgM産生の抑制作用はLPSによって打ち消されることが認められた。

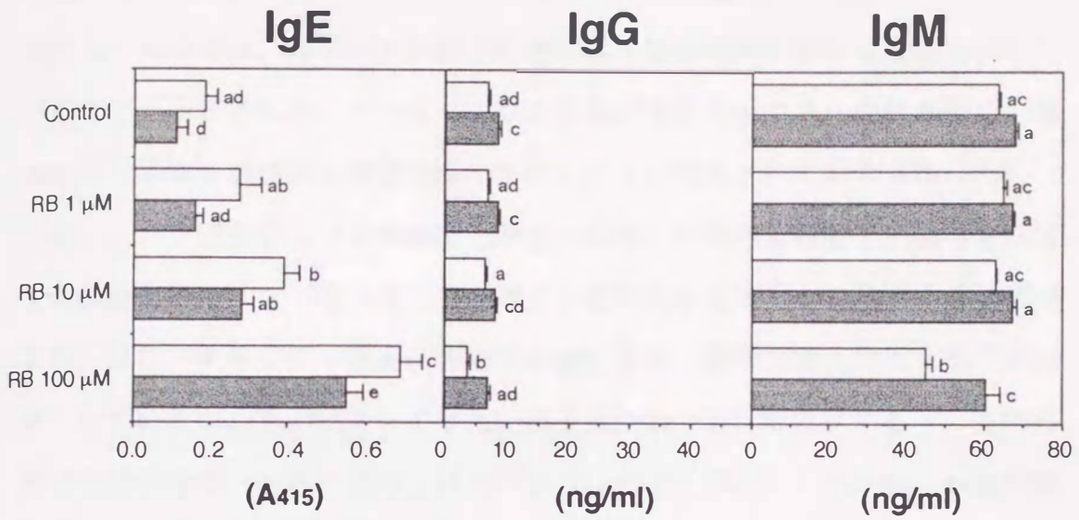
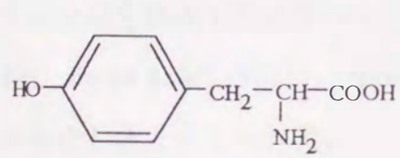


Fig. 5-8. Effect of LPS on IgE Production by WEHI-279 Cells Cultured with or without RB. Cells were incubated with each concentration of Rose Bengal for 48 h and culture supernatant was applied to ELISA to measure Ig concentration. Hatched or open column indicates the culture with or without LPS (2.5 μg/ml), respectively. $^{a\text{-}e}$Values in the same group without a common letter are significantly different at $p < 0.05$ (n=4).

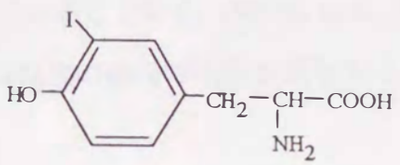
第4節　考察

第3章においては、食用色素が免疫機能に及ぼす影響について論じたが、本章においては色素を含む様々な食品添加物を用いて、それらがリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について検討した。その結果、キサンテン色素であるローズベンガルが50 μMにおいてIgE濃度を上昇させ、IgGおよびIgM濃度を低下させることが認められた。さらに、ローズベンガルの抗体産生調節機構を検討するため、様々なキサンテン色素を用いてリンパ球の抗体産生に及ぼす影響について調べた。その結果、4個のヨウ素原子と4個の塩素原子を有するローズベンガルが最も強いIgE濃度の上昇効果を示し、4個のヨウ素原子を有するエリスロシンがそれにつづくIgE濃度の上昇効果を示したが、4個の臭素原子と4個の塩素原子を有するフロキシンには弱い上昇効果しか認められなかった。さら

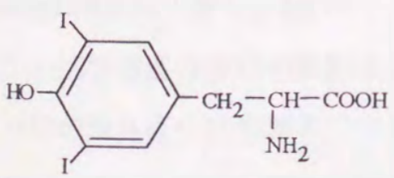
に、ハロゲン原子を持たないアシッドレッド、フルオレセインには抗体産生調節能は認められなかった。これらの結果から、芳香環に結合したハロゲン原子、特にヨウ素原子は、キサンテン色素の抗体産生調節効果に重要な役割を演じていることが示唆された。ローズベンガルを摂食させたマウスの甲状腺腫瘍の誘導にヨウ素原子が重要な役割を演じていることが報告されており（Ito *et al.*, 1986）、ヨウ素原子は甲状腺細胞と何らかの相互作用を及ぼしていることが考えられるため、リンパ球に対してどのような作用を及ぼすかを検討する必要がある。また、キサンテン色素は光増感反応により一重項酸素を放出することが知られているが、その色素をより重い原子（I>Br>H）で置換すると、光増感作用を受けやすいことが報告されている（Legrum, 1991）。胆汁酸、不飽和脂肪酸および過酸化水素がラット腸間膜リンパ節（MLN）リンパ球のIgE産生を増強し、他のクラスの抗体産生を抑制することが報告されており（Yamada *et al.*, 1996）、活性酸素の生成がキサンテン色素の抗体産生調節活性の原因であることも考えられる。



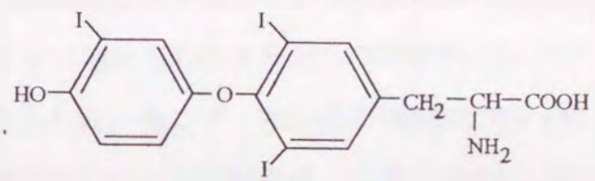
L-(+)tyrosine



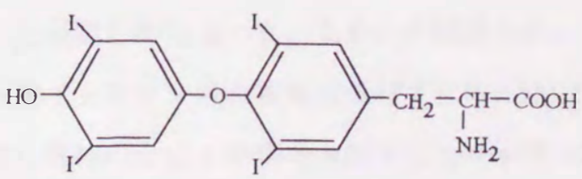
3-Iodo-L-(+)tyrosine



3,5-Diiodo-L-(+)tyrosine



3,5,3'-Triiodo-L-(+)thyronine



Tyroxine

Fig. 5-9. Structure of Tyrosine Derivatives and Thyroid Hormone.

キサンテン色素以外のヨウ素化合物の効果を調べるため、10 pMから3 mMのチロシン、モノヨードチロシン、ジヨードチロシン、トリヨードサイロニンおよびチロキシンをラット脾臓リンパ球に添加し、抗体産生に及ぼす影響を検討したが、これらのヨード化合物は全く抗体産生調節作用を示さなかった（未発表結果）。これらの結果は芳香環に結合したハロゲン原子の種類および数だけでなく、キサンテン色素の構造自身が抗体産生調節活性に関与していることが示唆している。

脾臓リンパ球を用いた実験ではT細胞の関与が考えられるので、ローズベンガルの抗体産生調節活性のメカニズムをさらに検討するためにマウスBリンパ腫WEHI-279細胞を用いてB細胞に対するローズベンガルの直接的な影響を検討した。WEHI-279細胞は高密度に細胞表面IgMを発現しており、抗体は産生していないという報告があるが（Gutman *et al.*, 1981）、本研究において本細胞が抗体産生能を有することが明らかとなった。さらに、WEHI-279細胞は、細胞分化における最終的な成熟期への細胞の活性化およびBリンパ球の免疫グロブリン合成を研究するモデルとして用いられていることから（Sibley *et al.*, 1980, 1981; Paige *et al.*, 1982）、今回用いた細胞は継代の過程で抗体を産生するように分化したと考えられた。

本研究ではローズベンガルをラット脾臓リンパ球に添加すると、培養上清中のIgE濃度は上昇し、IgGおよびIgM濃度は低下することが明らかとなったが、この抗体濃度の変化の原因としてリンパ球からの抗体分泌への影響およびリンパ球の抗体産生に影響の二つが考えられた。そこで、WEHI-279細胞に100 μMのローズベンガルを添加し24時間後の細胞内および細胞外（培養上清中）の抗体濃度を酵素抗体法で定量した結果、ローズベンガルは双方におけるIgE濃度を上昇させることが明らかとなった。これらの結果から、ローズベンガルはT細胞に由来するサイトカイン等の影響を受けずにB細胞に直接働きかけること、抗体分泌ではなく抗体の合成に影響を及ぼすことが示唆された。

ローズベンガルのIgE産生促進機構を検討するために、IgE重鎖mRNAであるPεの発現に及ぼすローズベンガルの影響について、RT-PCR法を用いて検討し

た。この結果、ローズベンガルはWEHI-279細胞のPεの発現を濃度依存的に増強することを見出した。一方、IgMからIgEへのクラススイッチにおいてε鎖の胚型転写物（Gε）の発現が認められるが（Alt *et al.*, 1982）、今回Gεの発現には影響を及ぼさないことから、ローズベンガルはIgMからIgEへのクラススイッチに影響せず、Pεの翻訳促進を通じてIgE合成を促進することが考えられた。同様に、Gεの発現に影響を及ぼすことなしにPεの発現を促進させた物質に関しては、Epstein-Barrウイルスで形質転換したヒトB細胞樹立細胞株である2C4/F3細胞をディーゼル排気ガス中の微粒子（DEP）と共に培養したとき、DEPに含まれる芳香族炭化水素であるフェナンスレンが細胞質中のAhレセプターに結合し、転写因子の誘導を通じてPεの発現を増強させることが報告されている（Tsien *et al.*, 1997）。フェナンスレンは非水溶性であり細胞膜を通過して細胞内に侵入できるが、ローズベンガルは水溶性であるために細胞内に入ることが出来ないことから、ローズベンガルによるPεの発現増強には別の機構、つまり細胞表面に結合しその結合シグナルが発現増強につながる可能性が考えられる。

また、今回用いたWEHI-279細胞はGεおよびGγ1を常時発現していることが本研究により明らかになっている（第２章を参照）。これは、IgM産生細胞からIgEまたはIgG1産生細胞にクラススイッチを起こしやすいことを意味しており、本来IgMを産生するこの細胞においてIgEおよびIgGの産生が認められる理由ではないかと考えられる。したがって、本細胞は種々の物質のクラス特異的抗体産生を検討する系として優れた細胞系であると考えられる。